

Série
N° D'ORDRE
139

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Mention Sciences)

PAR

Marie-Thérèse FAYET

Licenciée ès-Sciences

PREMIÈRE THÈSE. — DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES DANS UN
ÉPITHÉLIUM. APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA
MULTIPLICATION DU VIRUS ADHÉRENT.

DEUXIÈME THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 22 Décembre 1954 devant la Commission d'Examen

MM. COLONGE	Président.
MENTZER	} Examineurs.
CHOPIN	

LYON
BOSC Frères
Imprimeurs-Éditeurs
42, quai Gailleton, 42

1954

DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES
DANS UN EPITHELIUM
APPLICATION A L'ETUDE DE LA MULTIPLICATION
DU VIRUS APHTEUX

Série
N° D'ORDRE
139

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Mention Sciences)

PAR

Marie-Thérèse FAYET

Licenciée ès-Sciences

PREMIÈRE THÈSE. — DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS UN
ÉPITHÉLIUM. APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA
MULTIPLICATION DU VIRUS APHTEUX.

DEUXIÈME THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 22 Décembre 1954 devant la Commission d'Examen

MM. COLONGE	Président.
MENTZER	} Examineurs.
CHOPIN	

LYON
BOSC Frères
Imprimeurs-Éditeurs
42, quai Gailleton, 42

1954

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen Honoraire

M. LONGCHAMBON, O. ✱, 🏆, Médaille de la Résistance, 🌿 I., +.

Professeurs Honoraires

MM. DULAC, O. ✱, 🌿 I.	LOCQUIN, ✱, 🌿 I., Correspondant de l'Institut.
VANEY, ✱, 🌿 I., +.	DE LARAMBERGUE, 🌿. A.
MEUNIER L., O. ✱, 🌿 I.	
FROMAGEOT, 🌿 I.	

Doyen

M. DOUIN, O. ✱, 🏆, 🌿 I.

Assesseur

M. EYRAUD, ✱, 🌿 I.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON, O. ✱, 🏆, Médaille Résistance, 🌿 I., +, *Minéralogie.*
 DOUIN, O. ✱, 🏆, 🌿 I., *Botanique.*
 SOLLAUD, ✱, 🌿 I., *Zoologie.*
 DEJARDIN, O. ✱, 🌿 I., *Physique Générale.*
 EYRAUD, ✱, 🌿 I., *Calcul différentiel et intégral.*
 THIBAUD, 🌿 I., *Physique atomique.*
 THORAL, 🌿 I., *Géologie.*
 DŒUVRE, 🌿 I., *Chimie organique.*
 CORDIER, ✱, 🌿 I., Chevalier du Mérite Agricole, +, *Physiologie.*
 PRETTRE, ✱, 🌿 I., *Chimie industrielle.*
 KÜHNER, 🌿 I., *Botanique.*
 COURTY, 🌿 A., *Chimie-Physique.*
 AUMÉRAS, 🌿 I., *Chimie.*
 COLLONGE, 🌿 I., *Chimie.*
 PARIS, *Chimie minérale.*
 MALÉCOT, 🌿 I., *Mécanique rationnelle.*
 MENTZER, *Chimie biologique.*
 JANIN, *Physique.*
 BERNARD, 🌿 A., *Physique.*
 VIRET, ✱, 🌿 I., *Géologie.*
 MOUSSA, *Physique.*

Maître de Conférences honoraire

M. MOURIER DES GAYETS, 🌿 I., Chevalier du Mérite Agricole.

Maîtres de Conférences

MM. NIGON, <i>Zoologie.</i>	MM. CUEILLERON, <i>Chimie.</i>
WAUTIER, <i>Zoologie.</i>	BOUTILLIER, <i>Minéralogie.</i>
BRACONNIER, <i>Mathématiques.</i>	BOIDIN, <i>Botanique.</i>

Chargés de cours complémentaires

MM. DUFAY, ✱, 🌿 I., *Astronomie et Physique supérieure.*
 GARRIGUES, 🌿 I., *Botanique.*
 M^{me} FIASSON, *Zoologie.*
 MM. GAUTHIER F., *Géologie.*
 MESNARD, *Physique.*
 PENNANEAC'H, *Mathématiques.*
 GAUTHIER J., *Chimie.*
 CHOPIN, *Chimie biologique.*
 DAVID L., *Géologie.*
 STRIEFLING, *Météorologie.*
 PELLETIER, *Géologie.*
 MAZENOT, *Géologie.*
 MURET, *Botanique.*
 FIASSON, *Zoologie.*
 TRANCHAT, *Physique.*



Secrétaire

M. ROUX, 🌿 I.

Les travaux qui font l'objet de notre thèse ont été réalisés au Laboratoire de Recherches Vétérinaires, fondation de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse ; ils représentent en fait le fruit d'une étroite collaboration entre ces deux organismes.

C'est avec joie que nous exprimons nos remerciements :

A Monsieur J. HIRTZ, Ingénieur-Docteur, Chef du Service de Physico-Chimie du Laboratoire de Recherches Vétérinaires. Ayant suscité nos recherches, il les a constamment guidées et encouragées par la part active qu'il y a prise et la confiance qu'il a bien voulu nous témoigner.

A Monsieur le Professeur MENTZER. Son enseignement a déjà marqué et orienté nos études dans le sens de la biochimie. Aimablement il a accepté de suivre ces recherches, pourtant assez éloignées de celles effectuées dans son laboratoire, et nous a prodigué ses conseils.

A Monsieur le Professeur COLONGE qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre thèse.

A Monsieur CHOPIN, chargé de cours de Chimie Biologique, pour son aide précieuse et l'intérêt qu'il a bien voulu manifester à notre travail.

A Monsieur le Professeur LUCAM, Directeur du Laboratoire de Recherches Vétérinaires, à Messieurs les Docteurs MÉRIEUX et VALLÉE, Gérants de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse, pour leur bienveillante générosité.

A Monsieur le Docteur MACKOWIACK, Directeur Technique de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse, et à Monsieur le Docteur GIRARD, qui ont facilité nos recherches et les ont suivies avec intérêt.

A nos collègues de l'I.F.F.A. et plus spécialement à Messieurs les Docteurs CAMAND et PETERMANN et à leurs équipes de

travail qui ont assuré les mesures d'infectivité et les dosages sérologiques, ainsi qu'à Messieurs EICHENLAUB, BÉZUIT et BÉRAT, qui nous ont fait profiter de leur habileté technique.

Enfin à tous ceux qui ont contribué à notre formation scientifique ou qui nous ont aidés par leur savoir, leur compétence ou leur amitié.

INTRODUCTION

La fièvre aphteuse est, du point de vue économique, la plus grave des maladies animales. Aussi la fabrication du vaccin antiaphteux est-elle d'une importance capitale. A l'heure actuelle, on tend à produire le virus aphteux, base de cette fabrication, par culture *in vitro* sur épithélium lingual bovin maintenu en survie selon la méthode de FRENKEL.

Pour en améliorer la technique, à côté des recherches biologiques et immunologiques, des études physico-chimiques ont été entreprises par le laboratoire de recherches de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse. Au cours de travaux antérieurs de ce laboratoire, on a ainsi étudié les phénomènes d'oxydo-réduction dans les cellules cultivées et, par chromatographie sur papier, les variations de concentration des acides aminés dans le milieu de culture [37].

Les données bibliographiques révèlent l'importance du rôle des acides nucléiques dans la croissance des tissus d'une part et dans la multiplication des virus d'autre part. Dès lors, il nous a paru intéressant de porter notre attention sur la recherche des acides nucléiques dans les cellules d'épithélium lingual mises en culture et infectées de virus aphteux. Or les difficultés techniques rencontrées dans l'application des méthodes classiques de dosage ont nécessité la mise au point d'une méthode nouvelle d'extraction des acides nucléiques de l'épithélium lingual bovin.

En appliquant cette méthode, nous avons cherché à déterminer les variations des teneurs en acides nucléiques des cellules infectées au cours de l'infection virale. Cette étude peut servir à préciser le mécanisme de la multiplication du virus ainsi que le comportement du tissu en culture, et fournir, sur le plan pratique, le moyen d'accroître le rendement en virus aphteux.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PLAN

INTRODUCTION

1^{re} PARTIE : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.

Chap. 1 : Les acides nucléiques dans les tissus animaux.

A. — Les acides nucléiques.

Structure du DNA.

B. — Rôle des acides nucléiques dans la synthèse protéique.

1. Localisation des acides nucléiques dans les tissus.

2. Relation entre acides nucléiques et protéinogénèse.

3. Mécanisme d'action des acides nucléiques dans la protéinogénèse.

Chap. II : Les acides nucléiques dans la multiplication des virus.

A. — Présence des acides nucléiques dans les virus.

B. — Relation entre acides nucléiques et multiplication des virus.

1. Faits biologiques.

2. Origine des éléments chimiques d'un virus bactérien.

C. — Théories sur la multiplication des virus.

Chap. II : Les acides nucléiques dans les tissus infectés de virus.

A. — Modifications observées par voie cytologique.

B. — Modifications observées par analyse chimique.

C. — Cas de la fièvre aphteuse.

Hypothèses antérieures.

But de nos recherches.

2° PARTIE : DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS L'ÉPITHÉLIUM LINGUAL BOVIN.

Chap. IV : Techniques et méthodes.

A. — Culture du virus de la fièvre aphteuse.

1. Technique.
2. Titrage d'infectivité.
3. Détermination quantitative de la fixation du complément.

B. — Broyage du tissu.

1. Essai d'un homogénéiseur.
2. Broyage dans un mortier.

C. — Choix des méthodes d'extraction des acides nucléiques.

D. — Dosage des acides nucléiques à l'état isolé.

1. DNA. Méthode de Dische.
2. RNA. Méthode de Mejbaum modifiée.
3. Phosphore. Méthode de Machebœuf et Delsal.

Chap. V. : Isolement des acides nucléiques de l'épithélium lingual bovin.

A. — Méthode de Schneider.

1. Fractionnement d'un épithélium lingual bovin.
 - a) broyage.
 - b) fractionnement des composés phosphorés.
 - c) résultats.
2. Application aux cultures de virus aphteux.
 - a) expériences.
 - b) résultats.
3. Sources possibles d'erreurs.

B. — Modifications de la méthode de Schneider.

1. Préparation d'un tissu standard.
2. Expérience A : Fractionnement Schneider classique
 - Résultats.
 - Discussion.

3. Expériences B : Méthode de Schneider modifiée.

B1 : conditions de température.

B2 : concentration de l'acide trichloracétique.

Conclusion.

C. — Mise au point d'une nouvelle méthode.

Expériences C1 : nouvelle méthode.

Expériences C2 : hydrolyse successive des acides nucléiques.

Expériences C3 : temps d'hydrolyse des acides nucléiques.

Expériences C4 : suppression de la fraction éthanol-eau.

D. — Confrontation de tous les résultats.

E. — Description de la méthode adoptée.

3^e PARTIE : LES ACIDES NUCLÉIQUES AU COURS DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS APHTEUX.

Chap. VI. : Cultures prolongées.

A. — Expériences.

B. — Résultats.

1. Relation entre acides nucléiques et multiplication du virus.

2. Variations du DNA.

3. Variations du RNA.

Chap. VII. : Début de culture.

A. — Expériences.

B. — Résultats.

1. Fixation du complément.

2. Variations du DNA.

3. Variations du RNA.

4. Tissu conservé à 4°.

Chap. VIII. : Discussion.

1. Absence de parallélisme entre variations des acides nucléiques et propriétés biologiques du virus.
2. Chute du RNA et stabilité du DNA.
3. Différences entre cultures virulente et témoin.
4. Relation avec des études antérieures.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

PREMIÈRE PARTIE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE PREMIER

LES ACIDES NUCLEIQUES DANS LES TISSUS ANIMAUX

A. — Les acides nucléiques.

Nous ne rappellerons pas ici la composition chimique des 2 types d'acides nucléiques : l'acide désoxyribose nucléique (DNA) et l'acide ribose nucléique (RNA). On pourra se référer à divers auteurs : DAVIDSON [14], MARKHAM et SMITH [52] par exemple. Nous nous bornerons à analyser quelques découvertes récentes qui ont jeté une lumière nouvelle sur le mécanisme d'action de ces corps.

Structure du DNA

En 1953, WATSON et CRICK [73,74] ont proposé pour les DNA une structure hélicoïdale qui a été confirmée par des études aux rayons X [30, 76]. Selon ces auteurs, les molécules seraient formées d'une chaîne où les groupes acide phosphorique et sucre alternent régulièrement. A chaque sucre est fixée une base : 2 de ces bases sont des purines (adénine et guanine) et 2 des pyrimidines (thymine et cytosine ou 5-méthyl-cytosine). Le premier point important est que la molécule comprend deux de ces chaînes enroulées en spirale autour d'un même axe. Le 2^e point est que ces chaînes sont unies l'une à l'autre par des liaisons hydrogènes entre les bases. Or seules certaines paires de bases sont possibles : un membre de la paire doit être une purine et l'autre une pyrimidine. Non seulement une purine est liée à une pyrimidine, mais si l'on admet que les bases existent sous la forme cétonique, forme tautomère la plus probable, les seules paires possibles sont alors :

adénine et thymine

guanine et cytosine (ou 5-méthyl-cytosine).

L'existence de ces paires est confirmée par les données analytiques [77] qui montrent que les quantités d'adénine et de thymine, ou de guanine et cytosine sont toujours semblables bien que le rapport adénine-guanine varie d'un échantillon à l'autre.

Ainsi la séquence des paires de bases le long de la fibre hélicoïdale peut constituer un code qui permet la transmission des caractéristiques génétiques. Quand les 2 chaînes sont déroulées et séparées, chacune agit comme moule (« template ») pour la formation de son propre partenaire de sorte que la fibre primitive se trouve reconstituée intégralement en 2 échantillons.

Cette hypothèse de structure du DNA n'est probablement pas applicable au RNA, car en remplaçant le désoxyribose par le ribose, l'atome d'oxygène supplémentaire rendrait trop étroit le contact pour l'application des forces de VAN DER WAALS [73].

B. — Rôle des acides nucléiques dans la synthèse protéique.

1. — Localisation des acides nucléiques dans les tissus

On sait que malgré leur nom, les acides nucléiques ne sont pas localisés uniquement dans le noyau des cellules. CASPERSSON et SCHULTZ [8] en 1936 démontrèrent la présence de RNA dans le cytoplasme où il est surtout localisé dans les mitochondries et les microsomes. Le RNA existe aussi dans les nucléoles [9]. Par contre le DNA paraît être localisé exclusivement dans le noyau.

2. — Relation entre acides nucléiques et protéinogénèse

La question du rôle des acides nucléiques dans la synthèse des protéines a été analysée par TERROINE [68]. Puisque le RNA est pratiquement le seul constituant nucléique du cytoplasme, on comprend que, dans la recherche des éléments directeurs de la synthèse protéique, c'est-à-dire de l'accroissement du cytoplasme ou de la formation des protéines que celui-ci rejette, on ait tout d'abord songé à l'intervention du RNA. On a prouvé qu'un lien obligatoire et très étroit unit l'intensité de toute protéinogénèse à la richesse en RNA de la cellule qui l'effectue.

Toute perturbation expérimentale apportée, soit au taux de RNA dans la cellule, soit à sa répartition, se traduit par une altération dans la grandeur et la marche de la protéinogénèse.

CASPERSSON [9] voit dans le noyau le siège principal sinon exclusif de la synthèse des protéines, parce que la formation et l'activité du RNA du cytoplasme sont dominées par l'activité nucléaire. Cette théorie de CASPERSSON est en contradiction avec les travaux déjà anciens de HAMMERLING [35] confirmés depuis par BRACHET et CHANTRENNE [4] et récemment par VANDERHAEGHE [70]. Des fragments anucléés d'une algue verte unicellulaire (*Acetabularia Mediterranea*) sont capables de croître de 37 % environ, et l'arrêt de la synthèse des protéines au bout de 15 à 20 jours ne serait pas dû au RNA cytoplasmique provenant du noyau, mais à l'absence de coenzymes nucléotidiques.

3. — *Mécanisme d'action des acides nucléiques dans la protéinogénèse.*

Bien que la synthèse des protéines soit liée surtout à la richesse en RNA, ASTBURY et BELL [2] font remarquer que la distance entre 2 nucléotides du DNA est approximativement 3,3 Å comme la distance entre 2 acides aminés dans les polypeptides. Il leur paraît difficile de croire qu'il n'y ait là rien de plus qu'une coïncidence. On peut imaginer que l'acide nucléique constituerait une sorte de peigne ; sur l'extrémité ou dans l'intervalle des dents de ce peigne viendraient se placer les restes d'acides aminés. La spécificité de l'acide nucléique entraînerait la formation d'une protéine bien déterminée. Selon FRESKA [29] les groupements phosphoriques négatifs de l'acide nucléique se fixant sur les groupements positifs de l'arginine dans la protéine on obtient un arrangement spécifique de dipôles. PAULING et DELBRUCK [56] envisagent même une double complémentarité : le modèle de protéine initial pré luderait à la synthèse d'un acide nucléique complémentaire à ce modèle, sur lequel viendraient se placer par complémentarité les acides aminés dans un ordre tel qu'ils reconstitueraient le modèle initial, puis la protéine se détacherait de l'acide nucléique.

Ces différentes hypothèses antérieures à l'hypothèse de structure hélicoïdale du DNA de WATSON et CRICK, sont établies en tenant compte de chaînes isolées de nucléotides, ce qui sup-

pose donc que les 2 spirales se détachent l'une de l'autre exigeant un apport d'énergie. Plus séduisante est l'hypothèse de GAMOW [31] sur les relations possibles entre structure du DNA et des protéines. Déjà WATSON et CRICK [74] suggèrent que l'espace laissé par la double chaîne hélicoïdale de polynucléotides permet l'enroulement autour du même axe de la chaîne hélicoïdale de polypeptides dans la formation de nucléoprotéine. GAMOW précise que cette structure du DNA contient des « trous » rhombiques limités par 4 nucléotides dont 3 sont arbitraires. Il y a donc 20 types de trous différents. Or les chaînes de polypeptides sont formées d'une vingtaine d'acides aminés différents essentiels aux organismes vivants. On peut penser que les acides aminés libres du milieu sont captés dans les trous de la molécule de DNA et s'unissent en donnant la chaîne peptidique correspondante.

Quelle que soit l'hypothèse adoptée, l'importance des acides nucléiques dans les phénomènes de reproduction est un fait expérimental, puisque les acides nucléiques se trouvent concentrés là où il y a intense production de protéines. Rien d'étonnant dès lors que leur rôle apparaisse capital dans le phénomène de la multiplication virale.

CHAPITRE II

LES ACIDES NUCLEIQUES DANS LA MULTIPLICATION DES VIRUS

Depuis qu'en 1933 SCHLESINGER [62] par l'analyse chimique montra qu'un bactériophage d'*Escherichia Coli* est formé d'une protéine et d'un acide nucléique qu'il identifia plus tard [63] comme du DNA, la présence d'acides nucléiques a été prouvée dans tous les virus, quelle que soit leur origine. Leur rôle s'est révélé essentiel dans le processus de multiplication.

A. — Présence des acides nucléiques dans les virus.

Les *virus végétaux* ont été les premiers isolés. BAWDEN et PIRIE [3] démontrent pour la mosaïque du tabac d'abord, puis pour les autres virus des plantes, au fur et à mesure de leur isolement, que ce sont des nucléoprotéines à ribose, et la chromatographie a permis d'établir que la composition en nucléotides des acides nucléiques obtenus à partir de chaque virus est différente (DORNER et KNIGHT) [16].

Au point de vue chimique les *virus des bactéries* (bactériophages) comportent sensiblement le même poids de protéine et d'acide nucléique [20]. Mais comme le souligne HERSHEY [36], ce n'est pas là une nucléoprotéine. La protéine est plus ou moins localisée dans une enveloppe dont le DNA peut être libéré par choc osmotique.

Si les virus végétaux contiennent exclusivement du RNA et les bactériophages presque exclusivement du DNA, les *virus animaux* contiennent soit du RNA, soit du DNA, soit DNA et RNA comme le virus de l'influenza.

TABLEAU I. — *Composition chimique des virus* [12 et 58]
Les résultats sont donnés en % de poids sec

V I R U S	PROTEINES	ACIDES NUCLEIQUES		LIPIDES
		D.N.A	R.N.A	
Mosaïque du tabac	94		6	
Mosaïque de la tomate	83		17	
Mosaïque du pois	79		21	
Bacteriophage T ₂ (Cohen)	50	37		
Bactériophage T ₂ (Taylor)	50	40,3	6,6	2,6
Sarcome de Roux			10	36,5
Encéphalomyélite du cheval			4,4	54
Influenza	67	2	3	
Vaccine	83	5,6		5,7
Papillome de Shope	89,5	8,7		1,5

En fait, il y a complexité chimique croissante en passant des virus végétaux, simples nucléoprotéines à ribose, aux virus bactériens et animaux, mais les protéines et les acides nucléiques sont les seuls constituants communs à tous les virus. Cette structure des virus est donc identique à celle des unités se reproduisant elles-mêmes ou synthétisant les protéines dans les cellules.

B. — Relations entre acides nucléiques et multiplication des virus.

1. — FAITS BIOLOGIQUES

Le lien entre la présence des acides nucléiques et la multiplication des virus ressort bien des travaux [51] sur le virus de la rave jaune. Ce virus purifié est formé de 2 composants qui ont même forme cristalline, même pHi, même mobilité électrophorétique, mêmes propriétés sérologiques, mais qu'on peut séparer par centrifugation fractionnée : le plus léger est une protéine libre, le plus lourd est une nucléoprotéine. Or seule cette dernière particule est virulente et peut se reproduire.

Dans les virus des bactéries, il semble aussi que les particules riches en DNA sont celles qui se reproduisent. On sait que les bactériophages sont formés d'une tête plus ou moins sphérique

et d'une queue ou cil. La microscopie électronique a permis, en particulier à PENSO [57], d'illustrer le phénomène d'attaque de la bactérie par le phage. Tout d'abord le phage se fixe sur la bactérie par l'extrémité de la queue. Le corps du phage se vide de petites particules, sous-unités essentiellement formées de DNA, qui pénètrent dans la bactérie en laissant une dépouille de phage à l'extérieur. Ces sous-unités se multiplient à l'intérieur de la bactérie puis forment des particules incomplètes. Celles-ci se munissent bientôt d'une queue qui s'allonge tandis que la tête s'épaissit, reformant ainsi de nouveaux phages que la lyse spontanée de la bactérie libère dans le milieu.

Pendant la première partie du phénomène (période éclipse), le virus disparaît totalement, car en rompant les bactéries par ultra-sons, on ne peut plus mettre en évidence aucune des propriétés du virus.

Une preuve de cette multiplication par petites sous-unités est donnée par le phénomène d'interférence : si on infecte une bactérie avec les phages T_2 et T_4 , on retrouve, à côté des phages initiaux, des particules nouvelles résultant de la recombinaison des phages T_2 et T_4 .

En raison de ces connaissances relativement précises sur les phages, on a cherché à établir un parallèle entre le comportement des bactériophages et celui des virus animaux. Des études de VON MAGNUS [71, 72] sur l'influenza et de SCHAFER [61] sur la peste aviaire ont mis en évidence une unité très petite, l'antigène soluble, qui apparaît au début de l'infection cellulaire. Cet antigène soluble se compose essentiellement de protéine et d'acide nucléique et HOYLE [40] le rapproche des sous-unités reproductibles du phage. Ceci est confirmé par le fait que l'antigène soluble, caractérisé par ses propriétés sérologiques, se multiplie avant l'apparition de particules infectieuses, comme dans le cas des sous-unités reproductrices du phage.

2. — ORIGINE DES ÉLÉMENTS CHIMIQUES D'UN VIRUS BACTÉRIEN

L'importance du rôle de l'acide nucléique dans la multiplication du virus ressort davantage des recherches chimiques permises par l'emploi des isotopes radio-actifs avec les phages attaquant les bactéries.

a) *Origine de l'acide nucléique.* — Le phage se développant à l'intérieur de la bactérie ne peut se synthétiser qu'à partir de lui-même et des éléments puisés dans la bactérie.

1. — Selon HERSHEY [36], si on cultive les phages marqués avec P^{32} sur des bactéries normales, on constate que $1/3$, voire $1/2$, du P^{32} se retrouve dans la 1^{re} génération du virus. Mais comme chaque virus donne naissance à un grand nombre de descendants, une *faible partie du DNA de chacun d'eux provient des parents*. Puisque ce n'est pas tout le DNA des parents qui est transmis, la transmission se fait sans doute sous forme d'assez petits fragments d'acide nucléique. Mais on peut penser aussi avec DELBRUCK [18] que, si chaque chaîne de DNA dédoublée reconstitue son partenaire, le nombre de duplications successives est important, car une seule particule de DNA donne naissance à un grand nombre. La perte, faible dès lors au cours d'une duplication, pourrait être liée aux coupures et nouvelles liaisons inhérentes à la production des deux doubles hélices filles de DNA. Au niveau de ces coupures et liaisons peuvent intervenir des échanges avec le matériel de l'hôte.

2. — En effet *une part beaucoup plus importante de DNA semble provenir de la bactérie infectée*. Lorsque le phage infecte la bactérie, le métabolisme des phospholipides et du RNA de la cellule cesse (COHEN) [11]. Par contre la cellule-hôte ne produit plus que du DNA du phage (SCHAFER) [61]. C'est que les matériaux formant le DNA de la progéniture proviennent, pour une part importante, du DNA de la bactérie, comme l'ont prouvé les travaux de KOZLOFF et PUTNAM [46] à l'aide de phages marqués avec du phosphore radio-actif. Or EVANS [20] souligne que le DNA contenu dans le virus est 2 ou 3 fois plus important que celui présent dans la cellule-hôte ; il faut donc que le DNA soit aussi synthétisé par la bactérie durant la croissance du virus.

Le DNA de la bactérie est-il transféré tel quel au virus ou est-il dégradé puis resynthétisé ? EVANS [20] pense que le transfert doit s'effectuer au niveau des nucléotides ou petits polynucléotides parce que d'une part, la composition du DNA du virus est différente de celle de la bactérie, et, d'autre part, le rapport :

$\frac{\% \text{ d'N d'acide nucléique du virus provenant de l'hôte}}{\% \text{ de P d'acide nucléique du virus provenant de l'hôte}}$
n'est pas égal à 1 mais à 1,3 environ.

Ainsi le phage détourne à son profit le mécanisme métabolique de l'hôte, probablement parce que l'acide nucléique des sous-unités infectantes est voisin d'un intermédiaire métabolique de la bactérie.

b) *Origine de la protéine du phage.* — Par contre, le transfert de la protéine de la bactérie au phage est très faible ou même nul [20]. D'autre part des expériences avec phages marqués avec S^{35} semblent prouver qu'il n'y a pas transfert de la protéine du virus à sa progéniture, ce qui s'explique bien si la protéine est localisée dans la dépouille du phage restant à l'extérieur de la bactérie infectée.

Le phage synthétise donc lui-même sa protéine, les particules d'acides nucléiques organisant les éléments puisés dans le milieu par l'intermédiaire de la cellule-hôte.

C. — Théories sur la multiplication des virus.

Ces différentes données sur les virus ont été à l'origine de plusieurs théories sur la multiplication virale, le rôle des acides nucléiques étant fondamental.

Pour HYDEN [41], les nucléoprotéines produites dans la cellule durant l'infection virale peuvent être regardées comme le virus lui-même en reproduction. Cette production de la substance du virus épuise les nucléoprotéines normales de la cellule, de sorte que le virus se reproduisant lui-même agit comme parasite sur les parties productrices de nucléoprotéines dans la cellule-hôte.

LURIA [47] en se basant sur l'étude des bactéries et des phages considère que ce parasitisme existe au niveau génétique. Lorsque le virus envahit la cellule, il apparaît en sous-unités qui remplaceraient les gènes de la cellule, et le mécanisme enzymatique de la cellule serait contrôlé par le déterminant génétique du virus.

SCHAFER [61] rapproche ces deux faits essentiels de la multiplication des virus : présence d'acides nucléiques et formation de sous-unités plus petites. La théorie de FREKSA selon laquelle

les acides nucléiques agissent comme moules dans la synthèse des protéines (comme celle de WATSON et CRICK complétée par GAMOW plus tard) situe la production de protéines à la surface de la molécule. Lorsque le virus envahit la cellule-hôte, il se divise en unités plus petites et augmente ainsi considérablement la surface réagissante.

C'est alors que, usurpant le mécanisme métabolique de son hôte, le virus se multiplie. EVANS [21] pense que la nucléoprotéine du virus doit ressembler étroitement à un élément nucléoprotéinique de la cellule-hôte et le remplace dans le mécanisme métabolique de la cellule. Alors la protéine du virus s'accumule et provoque la destruction de la cellule-hôte qui fournit le mécanisme métabolique et l'énergie pour la synthèse du virus. Ainsi le phénomène de multiplication du virus s'expliquerait par une analogie structurale entre nucléoprotéine du virus et de la cellule-hôte.

Il est dès lors possible de se représenter le mécanisme de l'infection et de la multiplication virales. Lorsqu'un virus entre en contact avec une cellule, il laisse probablement son enveloppe protéinique à l'extérieur. L'acide nucléique pénètre dans la cellule en se subdivisant en petites sous-unités. Sa ressemblance avec l'un des intermédiaires métaboliques de la cellule lui permet d'emprunter l'appareil enzymatique de son hôte. Les molécules en forme de double spirale de DNA se déroulent et les deux chaînes se séparent. Chacune reconstitue son complément qui se divise à nouveau selon la théorie de WATSON et CRICK. Pour cela les acides nucléiques du virus utilisent soit les acides nucléiques de la cellule-hôte, soit des fragments d'acides nucléiques (nucléotides, nucléosides ou même bases), voire les molécules simples provenant du milieu.

Soit parallèlement, soit postérieurement à la synthèse d'acides nucléiques se développe la synthèse de la protéine. Les acides aminés présents viennent se loger dans les « trous » rhombiques des molécules d'acide nucléique originel ou néoformé du virus qui joue le rôle de « moule », ce qui explique la déviation du métabolisme protéique de l'hôte.

Dans une période finale, les particules nucléiques s'entourent de leur enveloppe protéique. A ce moment, la cellule-hôte est complètement nécrosée ; elle se rompt et libère le virus.

CHAPITRE III

LES ACIDES NUCLEIQUES DANS LES TISSUS INFECTES DE VIRUS

Les connaissances sur les virus ont été acquises surtout grâce aux virus végétaux qu'on a pu cristalliser et aux virus des bactéries qu'il est possible d'isoler. Par contre la littérature concernant les virus animaux est plus réduite, car leurs préparations sont toujours souillées par des constituants du tissu-hôte. C'est pourquoi on a cherché à étudier le métabolisme des tissus infectés de virus et à noter les modifications produites dans la teneur en acides nucléiques par la multiplication des virus sur des organes entiers maintenus en survie, sur des fragments de tissus en culture ou en survie, voire sur des cellules isolées. Mais tandis que les uns ont cherché à mettre en évidence dans une coupe de tissu les masses d'acides nucléiques présentes en différents points de la cellule, d'autres ont déterminé la teneur globale en DNA et RNA d'une quantité de tissu donnée, sans recherche de localisation cellulaire.

A. — Modifications observées par voie cytologique.

Les modifications des teneurs en nucléo-protéines dans la reproduction virale à l'intérieur de la cellule ont été étudiées surtout par CASPERSSON [10] et HYDEN [41, 10] en se servant de méthodes histochimiques de coloration et des techniques de microscopie et microspectrographie d'absorption dans l'ultra-violet. Celle-ci consiste à mesurer l'absorption des différentes parties de la cellule vers 2600 Å, longueur d'onde pour laquelle l'absorption due aux acides nucléiques est maxima. L'intensité d'absorption permet d'apprécier la somme des 2 acides nucléi-

ques et de les localiser dans la cellule. Ces auteurs comparent cellules normales et cellules infectées de virus.

Les virus pantropiques, molluscum contagiosum et verrue, provoquent dans une cellule épidermique une intense production de masses Feulgen positives avec absorption dans l'ultra-violet à 2600 Å, ce qui met en évidence la présence de DNA, mais avec molluscum contagiosum, ces nucléoprotéines à désoxyribose se localisent dans le cytoplasme, et, avec la verrue, dans le noyau. Dans l'un et l'autre cas, le reste de la cellule se nécrose.

Les virus neurotropes se prêtent particulièrement bien à l'étude des cellules infectées puisque le phénomène de mitose n'interfère pas. HYDEN [41], avec le virus de la rage, observe une augmentation des nucléotides à désoxyribose dans le noyau, et les observations sont identiques avec la neurovaccine.

Dans le cas de la poliomyélite, il se produit d'abord une stimulation des nucléoles avec augmentation rapide du RNA des nucléoles et apparition dans le noyau de granules riches en RNA. Cette formation dans le noyau de masses étrangères de nucléoprotéines à ribose, corrélative à l'épuisement des nucléoprotéines du cytoplasme, est caractéristique de l'infection par le virus de la poliomyélite et celui du louping ill.

Dans tous les cas, il y a donc eu accumulation de nucléoprotéines, soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau, et la synthèse des protéines est en rapport direct avec la quantité d'acides nucléiques présents.

SOURANDER [67] a repris l'étude des effets de la rage, non sur cellules nerveuses adultes, mais sur cellules nerveuses embryonnaires. Le développement des cellules infectées est comparé à celui des cellules normales. Le cytoplasme de cellules nerveuses motrices d'embryons de poulets non infectés contient une grande quantité de RNA qui reste constante aux différents stades d'incubation. Le contenu en RNA du cytoplasme d'embryons infectés décroît progressivement et, en même temps, la masse de protéine, en commençant 5 à 6 jours après l'inoculation ; la disparition de RNA devient totale 10 jours après l'inoculation. La croissance du titre de virulence est corrélative de la décroissance du RNA et du poids de protéine formée. D'après SOURANDER, la souche Flury de la rage se multiplie dans le cytoplasme. Ici donc, il n'y a pas d'accumulation de substances nucléoprotéiniques, mais au contraire destruction du RNA.

B. — Modifications observées par analyse chimique.

Si les résultats des travaux de JOHNSON et ACKERMANN se rapportent bien à la cellule, leur méthode de travail est toute différente, puisque c'est par l'analyse chimique d'un nombre connu de cellules ou de noyaux qu'ils déterminent les quantités de DNA et RNA présentes dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule.

Déjà ACKERMANN et FRANCIS [1] avaient étudié les changements produits par le virus de l'herpès sur foie d'embryons de poulets. Pour l'ensemble du tissu, au cours de l'infection, il y a accroissement de la vitesse de synthèse des acides nucléiques, parallèlement à un accroissement de la vitesse de prolifération des cellules. Mais en ramenant les résultats à l'échelle d'une cellule, JOHNSON et ACKERMANN [44] ont prouvé qu'il n'y a pas de modification :

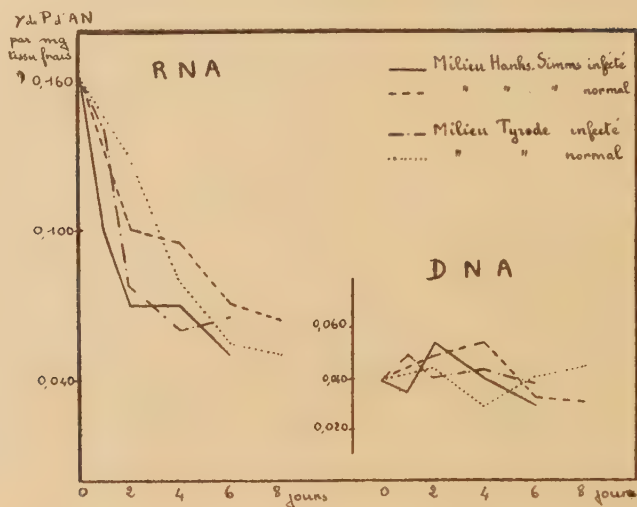
- 1° dans la quantité d'acides nucléiques présents dans une cellule ;
- 2° dans la distribution du DNA et du RNA de la cellule ;
- 3° dans la distribution du DNA et du RNA du noyau.

Ces auteurs sont arrivés aux mêmes conclusions, en se servant de cellules tumorales de souris infectées avec le virus de l'influenza.

Les travaux de WOMACK et KASS [78] portent également sur le virus de l'influenza mais en culture de tissu (membrane chorio-allantoïde). Comparant cultures normales et cultures infectées, ils dosent chimiquement les acides nucléiques. Dans ces cultures de tissu, il y a une décroissance progressive de RNA et des altérations paraissant non significatives de DNA. Dans la culture virulente la décroissance de RNA est plus rapide que dans la culture non infectée, mais l'effet du virus sur le DNA ne paraît pas appréciable (voir courbe p. 28).

Ces derniers travaux qui notent une décroissance ou une perte du RNA sont-ils en contradiction avec les précédents qui, par examen de la cellule, soulignaient l'accumulation de nucléoprotéines ? Faut-il penser, avec JOHNSON et ACKERMANN, que les anomalies Feulgen-positives de la cellule infectée ne sont pas détectables par l'analyse chimique pour le DNA ? En fait, il y a presque toujours interférence de deux phénomènes :

- 1° le développement du virus ;
 - 2° le développement du tissu,
- et un processus peut l'emporter sur l'autre,



Variations du DNA et du RNA dans des cultures de tissu infectées par le virus de l'influenza, d'après Womack et Kass.

WOMACK et KASS font remarquer que la décroissance du RNA dans la culture de tissu normal est la preuve que la multiplication des cellules est dominée par un net effet de dégradation qu'aggrave l'infection virale.

Ces résultats divers ne nous permettent donc pas de prévoir ce qui se passe dans le cas de la fièvre aphteuse.

C. — Cas de la fièvre aphteuse.

Les données sur la nature chimique du virus aphteux et les modifications chimiques qu'il provoque dans l'organisme atteint sont presque inexistantes.

Hypothèses antérieures

En 1938, JANSSEN [42] émet l'hypothèse que le virus de la fièvre aphteuse est une nucléoprotéine à ribose. Dans une préparation de virus purifié par précipitation avec le sulfate de

calcium, il met en évidence la présence d'un acide nucléique par spectrographie d'absorption dans l'ultra-violet. En comparant ce spectre d'absorption avec celui d'une protéine normale, il précise [43], en 1949, que la proportion d'acide nucléique doit être 11,6 %. N'ayant pu observer ni la réaction de Dische, ni celle de Feulgen, il pense qu'il s'agit d'un acide nucléique à ribose.

Cette hypothèse pourrait être renforcée par la remarque de HYDEN [41] qui constate que les plus gros virus (150 à 200 m μ) contiennent du DNA tandis que les plus petits (15 à 25 m μ) contiennent du RNA. Or le virus de la fièvre aphteuse est petit, d'ordre de grandeur de 20 m μ . Il est donc raisonnable de penser que ce virus contient du RNA.

But de nos recherches

Ces hypothèses peuvent nous inciter à porter une attention spéciale sur le RNA, mais les recherches sur les acides nucléiques en culture de tissu offrent des résultats bien divers.

En tout cas, l'analyse bibliographique met bien en lumière l'importance des acides nucléiques dans le métabolisme des tissus, pour la synthèse des protéines, et dans la multiplication des virus dont ils sont un constituant essentiel.

Or dans la culture in vitro du virus aphteux, ces deux phénomènes de vie du tissu et de reproduction du virus sont en cause. La connaissance des acides nucléiques peut donc aider à mieux comprendre ces phénomènes, et, en conséquence, fournir des moyens de les favoriser.

DEUXIÈME PARTIE

**DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES
DANS L'EPITHELIUM LINGUAL BOVIN**

CHAPITRE IV

TECHNIQUES ET METHODES

Pour étudier les acides nucléiques au cours de l'infection par le virus aphteux, nous avons cherché à extraire les acides nucléiques des cellules infectées en culture et à suivre, à intervalles réguliers, les variations de ces acides nucléiques corrélativement à des mesures biologiques ou sérologiques qui mettent en évidence le développement du virus.

A. — Culture du virus de la fièvre aphteuse.

Comme le virus ne peut se multiplier que dans les cellules vivantes, pendant de nombreuses années, le virus aphteux a été produit par inoculation dans la langue des bœufs. La mise au point de techniques modernes de cultures de tissus a permis de remplacer la culture du virus sur animaux par une culture in vitro plus pratique, plus économique et mieux contrôlable. Cette culture du virus aphteux est réalisée au laboratoire et dans l'industrie [25, 33] selon une technique due initialement à FRENKEL [24], perfectionnée de jour en jour et qui utilise l'épithélium lingual bovin en culture de tissu. Nous n'envisagerons ici que la culture à l'échelle du laboratoire.

1. — *Technique*

Les langues des bœufs tués à l'abattoir sont récoltées aussitôt après la mort de l'animal. Ces langues sont lavées et stérilisées superficiellement. Après élimination de la couche cornée, l'épithélium est prélevé en lambeaux minces, aussitôt placés dans un milieu nutritif. Ces lambeaux sont divisés en menus fragments de 1 à 2 mm³ à l'aide d'un ciseau mécanique spécial [23].

Le milieu de culture est soit un milieu de Baker modifié contenant des sels minéraux, des acides aminés, des vitamines, de la peptone, du glucose, soit un milieu simplifié au sérum ultrafiltré [33].

Le tissu en suspension dans le milieu de culture est placé dans un erlen de 500 ml. On ajoute un peu d'une solution de virus à cultiver et on place à 37°. Un lent barbotage d'oxygène à 5 % de gaz carbonique (carbogène) permet aux cellules de respirer. Le tissu en survie est infecté par le virus qui s'y multiplie. Le temps de culture, qui, pour la fabrication du vaccin, est d'une vingtaine d'heures, a été prolongé jusqu'à 50 et même 72 heures dans les cultures expérimentales.

A la fin de la culture, le tissu est séparé du liquide, broyé au mortier avec du quartz, remis en suspension dans le milieu, centrifugé et filtré. Le liquide obtenu contient des quantités importantes de virus.

Ces quantités de virus peuvent être mesurées :

- 1° par un titrage d'infectivité sur animaux ;
- 2° in vitro, par un dosage sérologique de fixation du complément.

2. — *Titrage d'infectivité*

Ce titrage d'infectivité se fait sur souriceaux [66]. On prépare des dilutions différentes de virus : en général 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Chaque dilution de virus est inoculée à 5 souriceaux. Les réactions positives sont révélées par la mort des souriceaux.

A partir des résultats obtenus, des tables de calcul, établies selon la méthode de REED et MUENCH [60], permettent le calcul de la dose létale à 50 % qui, par convention, désigne le titre d'infectivité du virus.

3. — *Détermination quantitative de la fixation du complément*

La détermination quantitative de fixation du complément est une mesure des propriétés antigéniques du virus. Pour qu'un antigène et un anticorps réagissent, la présence du complément, substance thermolabile du sérum, est nécessaire. Si donc on met en présence d'un antigène inconnu et d'un anticorps connu, une quantité déterminée de complément, la quantité de complément fixée sera sensiblement proportionnelle à l'antigène en

présence. Il est possible de déterminer la quantité de complément correspondant à l'antigène par dosage en retour de l'excès de complément. Pour cela, on utilise une deuxième réaction antigène-anticorps qui a l'avantage d'être mesurable colorimétriquement : l'hémolyse d'hématies.

La technique employée au laboratoire a été mise au point par CAMAND et HIRTZ [7, 6] en appliquant la méthode de BROOKSBY [5]. Les résultats sont exprimés en logarithme de la dose de complément fixée.

Malgré les différences fondamentales entre la technique biologique de titrage d'infectivité et cette méthode sérologique de détermination quantitative de fixation du complément, ces deux mesures de la virulence varient le plus souvent de façon parallèle.

La mesure d'infectivité est d'autant plus précise qu'elle est pratiquée sur un plus grand nombre d'animaux. Malgré l'emploi du calcul statistique, la précision des résultats est plus aléatoire que celle de la fixation du complément qui, produite *in vitro*, est indépendante des variations individuelles des animaux.

B. — Broyage du tissu.

L'extraction des acides nucléiques de l'épithélium lingual bovin mis en culture et infecté de virus exige une opération préliminaire de broyage. Or le broyage de l'épithélium lingual pose un problème spécial, étant donné qu'il s'agit pour l'animal d'un tissu de protection extrêmement solide en même temps que souple.

1. — Essais d'un homogénéiseur

Un homogénéiseur du type de POTTER-ELVHJEM [59] a été construit et essayé. Il est formé d'un piston en verre tournant, à une vitesse de l'ordre de 1.000 tours par minute, dans un tube à essais, en verre épais. La partie renflée du piston est soufflée dans le tube de façon à s'ajuster exactement au fond. Les côtés du piston sont verticaux sur 6 ou 7 mm. et le bas du piston est hérissé de quelques aspérités de verre. Le tissu (1 à 2 g.) et quelques ml. de sérum physiologique sont soumis au

broyage dans le tube refroidi extérieurement par un courant d'eau.

Les essais entrepris avec l'épithélium lingual ne furent pas satisfaisants. Les particules d'épithélium arrivent à se placer entre les parois verticales du tube et du piston où elles sont alors amincies mais finalement entraînées vers le haut. Par ailleurs il se produit un échauffement tel que des étincelles jaillissent malgré la présence du sérum physiologique à l'intérieur du tube et d'un réfrigérant à l'extérieur.

2. — *Broyage dans un mortier.*

Le broyage est donc fait dans un mortier avec du quartz, et le broyat est repris par du sérum physiologique. Au cours de nos recherches, nous serons amenés à préciser et à modifier les conditions de température, de temps de broyage et de liquide d'élu-tion.

C. — *Choix des méthodes d'extraction des acides nucléiques.*

Pour doser les acides nucléiques, il existe plusieurs méthodes d'extraction à partir du tissu. En général, il n'est pas possible d'isoler quantitativement à l'état pur les deux types d'acides nucléiques contenus dans un tissu. Aussi commence-t-on souvent par extraire des tissus les substances susceptibles d'inter-férer avec les acides nucléiques dans les dosages. C'est pourquoi, dans les méthodes suivantes, les tissus sont d'abord épuisés par l'acide trichloracétique froid pour éliminer les composés phos-porés acido-solubles, puis délipidés.

Dans la méthode de OGUR et ROSEN [55], on extrait le RNA par un contact prolongé des tissus avec l'acide perchlorique froid, puis le DNA est extrait par l'acide perchlorique chaud. L'avantage de cette méthode est de permettre le dosage direct des acides nucléiques par spectrophotométrie dans l'ultra-violet, car l'acide perchlorique, contrairement à l'acide trichloracé-tique n'absorbe pas dans l'ultra-violet au voisinage de 2.600 Å. L'absence de spectrophotomètre dans notre laboratoire nous a fait rejeter cette méthode d'ailleurs utilisée surtout pour les tissus végétaux.

La méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER [64] permet aussi de séparer DNA et RNA. Les tissus sont traités par la potasse N à 37° pendant 15 heures ; ils sont alors complètement solubilisés, le phosphore des phosphoprotéines est libéré. Mais tandis que le RNA est transformé en nucléotides acido-solubles, le DNA n'est pas affecté. Par acidification, il précipite avec les protéines. Le dosage des acides nucléiques ne peut se faire que par des dosages de phosphore. Le P du RNA est obtenu par dosage du P organique de la liqueur acidifiée. Le P du DNA est obtenu par différence entre le P total de la liqueur alcaline initiale et de la liqueur acidifiée.

Cette méthode exige donc une expérimentation assez longue. Elle a l'intérêt de permettre la séparation des 2 acides nucléiques, ce qui est essentiel dans le cas d'expériences avec atomes de P radioactif. Mais cette séparation des 2 acides nucléiques n'est pas toujours complète [19]. D'autre part, un dosage d'acides nucléiques reposant uniquement sur le P peut conduire à des résultats erronés, la proportion de P n'étant pas la même dans tous les acides nucléiques.

C'est pourquoi, nous lui avons préféré la méthode de SCHNEIDER [65], applicable aussi aux tissus animaux, et qui est plus simple et plus rapide. Les deux acides nucléiques sont extraits des tissus par l'acide trichloracétique à 5 % à chaud. Dans ces conditions, les protéines restent insolubilisées. Sur l'extract trichloracétique, on peut doser directement le DNA et le RNA par des méthodes colorimétriques, sans qu'il soit nécessaire de les séparer .

D. — Dosage des acides nucléiques à l'état isolé.

Ce sont les méthodes colorimétriques de dosage des acides nucléiques que nous avons adoptées parce qu'elles sont suffisamment précises pour de faibles quantités de substances et permettent le dosage spécifique de chacun des deux acides nucléiques en mélange dans une même solution.

Le colorimètre employé est le colorimètre Electro-Synthèse.

Pour le dosage du DNA, nous avons choisi la méthode de DISCHE [17] à la diphenylamine.

Pour le dosage de RNA, étant donné que les mesures portent

sur un grand nombre de tubes, nous avons mis au point une méthode modifiée à partir de la méthode de MEJBAUM [53].

Un dosage de phosphore total, selon la méthode de MACHEBŒUF et DELSAL [69], nous a servi dans certains cas de test de contrôle.

Pour chacun de ces dosages, des recherches préliminaires nous ont permis de préciser le temps optimum d'hydrolyse, le temps nécessaire à la stabilisation de la couleur, la longueur d'onde de l'électrocolorimètre permettant la plus grande sensibilité de réaction, et, pour le phosphore, le degré de minéralisation nécessaire.

1. — DOSAGE DU DNA. MÉTHODE DE DISCHE

Le DNA, chauffé en milieu acide avec la diphénylamine, développe une coloration bleue due au désoxyribose des nucléotides à bases puriques.

Réactif. — 1 g. de diphénylamine
+ 100 ml d'acide acétique glacial
+ 2,75 ml SO_4H_2 $d = 1,84$.

Technique. — Le dosage s'effectue dans des tubes calibrés de 16 mm. de diamètre du colorimètre. Pour chaque solution à doser, il faut préparer un tube contenant :

2 ml de solution
+ 4 ml de réactif.

Pour l'ensemble des solutions à doser, un tube témoin contient :

2 ml d'eau
+ 4 ml de réactif.

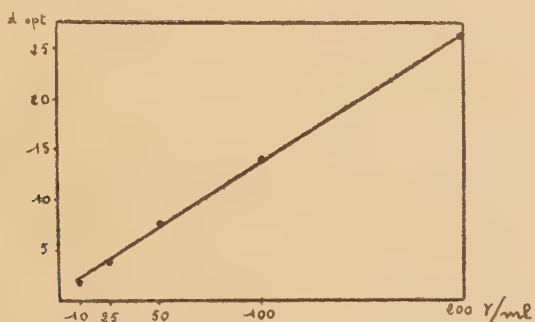
Les tubes sont portés au bain-marie bouillant pendant 10 minutes puis refroidis sous un courant d'eau. Après 30 minutes la lecture au colorimètre se fait en lumière orangée, l'appareil étant mis à zéro avec le témoin.

Résultats. — Pour chaque série de dosage, une courbe d'étalement est établie avec des solutions titrées de DNA. Dans nos expériences, étant donné que le DNA est dissous dans l'acide trichloracétique à 5 % ayant subi une hydrolyse à 90°, les solutions titrées ont été préparées en dissolvant de l'acide thymonucléique du commerce dans quelques gouttes

de soude $\frac{N}{100}$, puis en ajoutant l'acide trichloracétique à 5 %. La solution se trouble, mais redevient limpide après hydrolyse à 90°. Le temps d'hydrolyse est le même que celui de la solution correspondante d'acides nucléiques. Ces solutions témoins sont conservées à 2°.

Un dosage de P selon la méthode de MACHEBŒUF et DELSAL et un microdosage d'N par la méthode de KJELDAHL ont donné le rapport $\frac{N}{P} = 1,56$. Cette valeur est voisine de 1,69, valeur théorique conforme à l'hypothèse de la structure tétranucléotidique.

Pour des concentrations comprises entre 10 et 200 γ de DNA par ml la courbe d'étalonnage I montre que la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée.



Courbe I. — Courbe d'étalonnage du DNA.

Remarque. — La méthode classique de dosage prévoit un deuxième témoin contenant :

2 ml de solution

+ 4 ml de réactif sans diphénylamine

pour le cas où une coloration parasite se produirait entre la solution et le réactif sans diphénylamine. Or, l'emploi de ce deuxième témoin est inutile dans les dosages de DNA sur les différentes solutions provenant du fractionnement, car son pouvoir d'absorption est toujours plus faible que celui du témoin avec eau qui sert à l'étalonnage de l'appareil.

2. — DOSAGE DU RNA. MÉTHODE DE MEJBAUM MODIFIÉE

Cette méthode utilise la réaction de Bial. Le RNA chauffé avec l'acide chlorhydrique en présence d'orcine et de chlorure ferrique donne une coloration verte intense. Cette coloration est due au ribose : les sucres chauffés avec un acide concentré se déshydratent en composés furfuroliques qui fournissent avec les polyphénols des colorations caractéristiques. Lorsque la concentration est forte, le colorant apparaît sous forme d'un léger précipité sombre. Ce colorant est soluble dans l'alcool amylique et MEJBAUM se sert de cette solubilité pour l'isoler. Mais lorsque la concentration est plus faible, l'alcool éthylique suffit à solubiliser et stabiliser le colorant sans nécessiter des extractions successives, et c'est ce procédé que nous avons employé.

Réactif. — Solution d'orcine à 10 mg par ml d'une solution contenant 0,1 % de Cl_3Fe , $6\text{H}_2\text{O}$ dans l'acide chlorhydrique concentré.

Ce réactif est à préparer extemporanément.

Technique. — Le dosage s'effectue dans les tubes calibrés de 12 mm. du colorimètre.

Pour chaque solution à doser, il faut préparer un tube contenant :

1 ml de solution
+ 1 ml de réactif.

Pour l'ensemble des solutions à doser, un tube témoin contient :

1 ml d'eau
+ 1 ml de réactif.

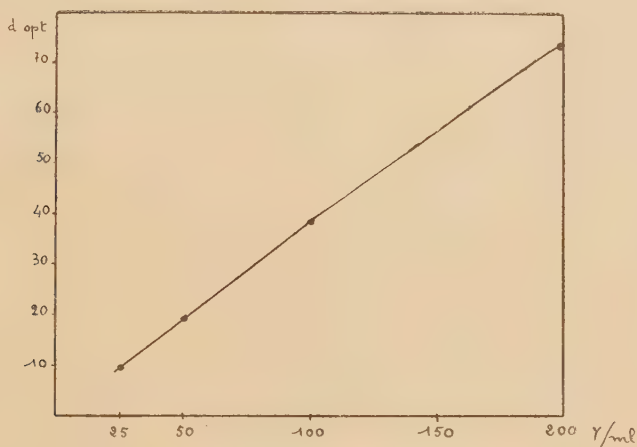
L'ensemble des tubes est porté au bain-marie bouillant pendant 20 minutes, puis refroidi sous un courant d'eau. Dans chaque tube, on ajoute 1 ml d'éthanol à 95 et on agite. La lecture au colorimètre peut se faire immédiatement en lumière orangée, mais la couleur est stable, et la lecture peut être faite plus tard sans inconvénient.

Résultats. — Comme dans le cas du DNA, pour chaque série de dosage, une courbe d'étalonnage est établie avec des solutions titrées de RNA dans l'acide trichloracétique à 5 %, ayant subi le temps d'hydrolyse voulu à 90°.

Les courbes d'étalonnage ont été faites à partir de RNA préparé au laboratoire, avec de la levure fraîche, selon la méthode indiquée par MALLETTE et LAMANNA [49] qui consiste à éliminer les protéines et le DNA par dissolution de la levure dans la soude suivie d'une précipitation acétique, puis à précipiter le RNA par l'alcool, toutes les opérations étant conduites entre 0 et 4°.

La valeur du rapport $\frac{N}{P}$ de cette préparation est égale à 1,64, voisine de 1,69, proposée par l'hypothèse de la structure tétranucléotidique.

La loi de BEER-LAMBERT se vérifie pour les concentrations comprises entre 25 et 200 γ par ml (courbe II).



Courbe II. — Courbe d'étalonnage du RNA.

Remarque. — Comme pour le DNA, un deuxième témoin fait avec la solution et le réactif sans orcine s'est avéré inutile parce que plus clair que le témoin utilisé.

Correction due au DNA. — La liqueur trichloracétique provenant du fractionnement de Schneider contient à la fois RNA et DNA. Or le DNA, dans les mêmes conditions d'expériences, donne avec le réactif de MEJBAUM une coloration identique à celle du RNA, mais plus faible. Avec les échantillons de RNA et de DNA dont nous disposons, nous avons établi que

1 g. de DNA donne en moyenne la même coloration que 0,19 g. de RNA (tableau I). Il faut donc apporter une correction due à la teneur en DNA déterminée au préalable par dosage selon DISCHE.

Quantité d'acides nucléiques en γ	d. opt. D.N.A	d. opt. R.N.A	Rapport	$\frac{\text{d. opt. D.N.A}}{\text{d. opt. R.N.A}}$	
				d. opt. D.N.A	d. opt. R.N.A
50	2,5	12,5	0,200	} moyenne	0,190
100	5,5	28,5	0,194		
150	8	42	0,191		
200	10,75	57,5	0,187		

TABLEAU I. — Rapport des densités optiques des colorations dues au DNA et au RNA avec le réactif de Meijbaum.

3. — DOSAGE DU P TOTAL. MÉTHODE DE MACHEBŒUF ET DELSAL

Le dosage de P total selon la méthode de MACHEBŒUF et DELSAL est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone avec apparition d'une couleur bleue.

Réactifs. — 1. Acide sulfurique concentré ;

2. Acide nitrique ;

3. Molybdate d'ammonium : solution aqueuse à 5 % ;

4. Sulfite de soude : solution aqueuse à 20 % ;

5. Hydroquinone : solution aqueuse à 0,5 %.

+ 1 goutte d'acide sulfurique dans 100 ml.

Technique. — Le P organique est d'abord minéralisé par attaque à chaud avec 0,3 ml d'acide sulfurique et 0,4 ml d'acide nitrique. Le chauffage doux des matras sur la rampe est poursuivi jusqu'à apparition de fumées blanches.

Les tubes servant au dosage sont les tubes calibrés de 16 mm. du colorimètre avec un trait de repère à 6 ml.

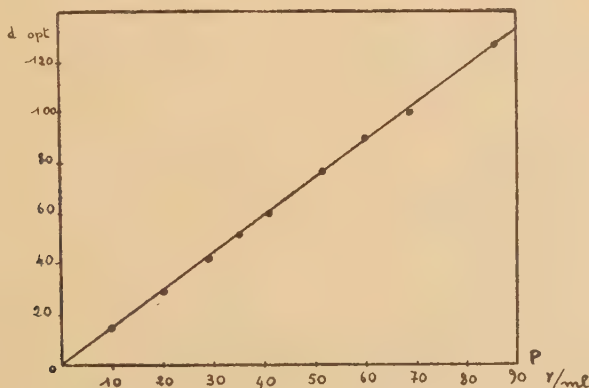
Le produit de l'attaque, refroidi, est repris par l'eau distillée et, par plusieurs rinçages successifs, le volume est amené à une quan-

tité un peu inférieure à 6 ml. On porte au bain-marie bouillant pendant 15 minutes pour hydrolyser les pyro et métaphosphates qui auraient pu se produire au cours de l'attaque et les transformer en orthophosphates. Après refroidissement, le volume est amené à 6 ml avec l'eau distillée, puis on ajoute successivement et en agitant chaque fois :

- 2 ml de la solution molybdique ;
- 1 ml de la solution de sulfite ;
- 1 ml de la solution d'hydroquinone.

Après 30 minutes, la lecture au colorimètre se fait en lumière orangée. La mise à zéro de l'appareil se fait avec un témoin sans phosphate, mais contenant tous les réactifs.

Résultats. — Pour chaque série de dosages, une courbe d'étalonnage est établie avec des solutions de phosphate monopotassique contenant une quantité connue de P. On constate que les concentrations en P comprises entre 0 et 90 γ vérifient la loi de BEER-LAMBERT (courbe III).



Courbe III. — Courbe d'étalonnage du P total.

CHAPITRE V

ISOLEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES DE L'EPITHELIUM LINGUAL BOVIN

L'isolement des acides nucléiques de l'épithélium lingual bovin comprend deux stades :

- 1° le broyage du tissu ;
- 2° l'extraction des acides nucléiques.

L'une et l'autre de ces opérations sont importantes, et la nature du tissu épithélial a demandé pour chacune d'elles une mise au point spéciale.

A. — Méthode de Schneider.

Nos premiers essais ont été faits avec la méthode de SCHNEIDER sur un échantillon d'épithélium lingual bovin puis sur des tissus provenant de cultures in vitro du virus aphteux.

1. — FRACTIONNEMENT D'UN ÉPITHÉLIUM LINGUAL BOVIN

a) *Broyage*. 3 g. de tissu bien essoré sont broyés avec 0,5 g. de quartz pendant 15 à 20 minutes, temps nécessaire pour désintégrer suffisamment les cellules, à la température ordinaire. La pâte assez compacte qui en résulte est reprise par 16 ml de sérum physiologique en formant une suspension bien homogène.

8 ml de ce broyat sont prélevés à l'aide d'un rhéomètre et versés dans un tube de centrifugeuse et 8 ml mis dans un creuset. Celui-ci est séché à 105°, taré, puis calciné et pesé à nouveau, ce qui donne le poids de substance sèche correspondante.

b) *Fractionnement des composés phosphorés.* Le broyat placé dans le tube de centrifugeuse est alors soumis au fractionnement des composés phosphorés selon la méthode de SCHNEIDER.

Toutes les centrifugations sont faites avec la Centrifugeuse réfrigérée (International Equipment C°, Boston, Mass. USA). Le rotor utilisé comprend 8 tubes de 35 ml environ, de diamètre intérieur 28 mm. Les centrifugations sont faites entre 2 et 5°, dans un champ de 3500 g (5.000 tours par minute).

1° Extraction des substances acido-solubles. A l'homogénéisat de tissu, on ajoute 20 ml d'acide trichloracétique (ATC) à 10 %, à la température de 4°. Les protéines sont précipitées. Après centrifugation, le surnageant est recueilli et le culot repris par 5 ml d'ATC à 10 %. Après centrifugation et décantation du surnageant qui est réuni au 1^{er} et forme la fraction acido-soluble, le culot est rincé par 1 ml d'eau et 4 ml d'éthanol à 95°, puis par 5 ml d'éthanol. Ces opérations sont conduites rapidement, en moins de 20 minutes, pour éviter l'action prolongée de l'ATC à 10 % froid.

2° Extraction des lipides. Les lipides sont extraits par 5 ml d'un mélange alcool-éther (3 vol. - 1 vol.) à l'ébullition pendant 3 minutes. Cette opération est répétée 3 fois. La fraction lipidique est en général rejetée.

3° Extraction des acides nucléiques. Les acides nucléiques sont alors extraits par 5 ml d'ATC à 5 %, au bain-marie à 90°, pendant 15 minutes. Après centrifugation le surnageant est récolté et le culot est repris par 2,5 ml d'ATC à 5 % froid. Les 2 surnageants sont réunis, et leur volume total est mesuré. Dans les dernières expériences, pour simplifier les calculs et obtenir une plus grande précision, le volume de la fraction acides nucléiques a été complété à 10 ml exactement par l'ATC à 5 %. La fraction acides nucléiques est filtrée et conservée au réfrigérateur jusqu'au moment des dosages de DNA et RNA.

4° Les phosphoprotéines peuvent être extraites du culot de centrifugation par 5 ml de soude à 2 %, au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Dans nos expériences, après extraction de la fraction acides nucléiques, le culot de centrifugation est rejeté.

c) *Résultats.* Dans un premier essai de fractionnement fait sur l'épithélium lingual bovin, les différentes fractions ont été

retenues, et un dosage de phosphore total, pratiqué sur des parties aliquotes de chacune d'elles, selon la méthode de MACHEBŒUF et DELSAL, permet de se rendre compte des proportions de P contenu dans chaque fraction (tableau I).

La différence entre la somme du P des différentes fractions et le P total de l'homogénéisat provient sans doute d'une erreur relative importante intervenue sur le dosage du P dans l'homogénéisat de tissu étant donné que ce dosage s'est fait sur un faible volume.

FRACTION CONSIDEREE	P dans la fraction (en γ)	% du P total
Homogénéisat du tissu	3.000	
Fraction acido-soluble	1.687,5	56,25
Phospho-lipides	396	13,2
Acides nucléiques	462	15,4
Phospho-protéines	264	8,8
Culot de centrifugation final	24	0,8
		Total 94,55 %

TABLEAU I. — P total dans les différentes fractions.

2. — APPLICATION AUX CULTURES DE VIRUS APHTEUX

a) *Expériences.* C'est cette méthode de SCHNEIDER qui a été appliquée à un broyat de cellules d'épithélium lingual provenant d'une culture de virus aphteux selon la méthode de FRENKEL. Les prélèvements de tissu faits sur la culture sont conservés au réfrigérateur en attendant leur utilisation. Ces prélèvements sont faits au moment de la mise en culture (temps 0) puis après 5 h., 10 h., 15 h., 20 h., 25 h., 30 h., 40 h., 50 h., 60 h. et 72 h. de culture. 8 expériences ont été faites sur des tissus provenant de culture de virus A ou C.

b) *Résultats.* A titre d'exemple, la figure I représente les résultats obtenus au cours de la culture C3. Le virus est du type C. Les quantités de DNA, RNA et P de la fraction acides nucléiques, sont indiquées en γ par mg de substance sèche. Les courbes d'infectivité et de fixation du complément sont également marquées.

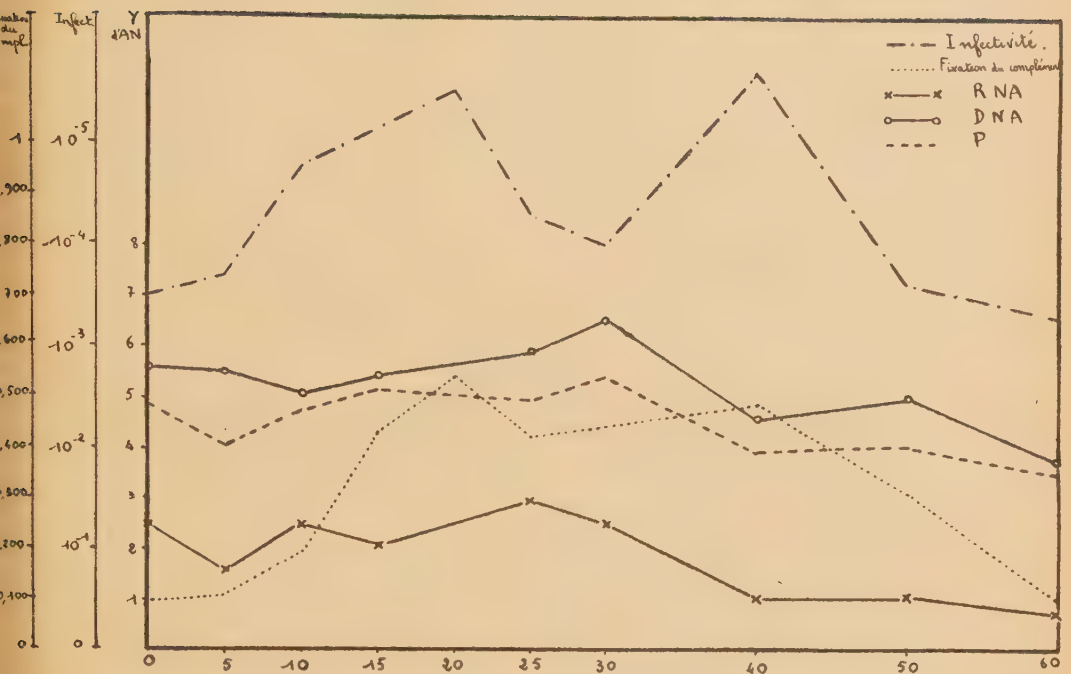


FIGURE I. — Résultats de la culture C3.

Des 8 expériences faites, un certain nombre de faits ressortent.

1° Dans chacune de ces expériences, les courbes de variation du DNA et du RNA présentent une allure zigzagante. Une culture témoin non virulente faite dans les mêmes conditions que la culture virulente présente aussi des variations irrégulières des teneurs en DNA et RNA.

2° Dans chaque expérience, alors que les courbes d'infectivité et de fixation du complément présentent un certain parallélisme, il semble difficile d'établir une relation entre elles et les courbes de DNA et RNA.

3° Pour l'ensemble des expériences, il ne paraît pas possible d'établir une loi générale de variation. De fortes différences apparaissent d'une expérience à l'autre, non seulement dans la variation des quantités de DNA et RNA, mais encore dans les quantités présentes au départ dans le tissu initial :

de 2 à 6 γ par mg pour le DNA ;
de 1,3 à 3 γ par mg pour le RNA.

4° Ce qui nous a conduit à chercher par la même méthode les quantités d'acides nucléiques présents dans l'épithélium lingual bovin suivant l'âge, le sexe, l'état de santé, la race de l'animal. Là encore, une expérimentation qui a porté sur l'épithélium lingual de 28 bovins a fourni des chiffres très différents, même lorsqu'il s'agit d'animaux très semblables. A titre d'exemple le tableau suivant donne les quantités de DNA, de RNA et de P fournies par des châtrons limousins de 18 mois.

N° de l'expérience	D.N.A	R.N.A	P
2	3,65	3,16	0,49
2	3,80	3,88	0,53
3	3,16	2,80	0,50
3	3,68	2,82	0,51
4	4,52	2,85	0,58
4	4,34	7,75	0,94

TABLEAU II. — DNA, RNA et P dans l'épithélium lingual de châtrons limousins.

5° A l'occasion de ces expériences, un dosage fait en double sur le même tissu à un jour d'intervalle donna des résultats différents.

	DNA	RNA
1 ^{er} jour	4,11	2,73
2 ^e jour	5,84	2,95

3. — SOURCES POSSIBLES D'ERREURS

Quelles sont donc les sources possibles d'erreurs ?

a) Le tissu reste en survie et par conséquent les enzymes présents dans le tissu libérés par le broyage peuvent provoquer une hydrolyse des acides nucléiques qui seraient alors entraînés sous forme de nucléotides dans la fraction acido-soluble.

b) Cette dégradation des acides nucléiques en nucléotides

peut être provoquée par l'ATC même froid si la concentration est trop forte ou le temps d'action trop prolongé.

c) S'agit-il d'un broyage insuffisant qui ne permette pas d'extraire complètement les acides nucléiques des noyaux des cellules, donc plus spécialement le DNA ? Un essai fait dans le but de répondre à cette question a prouvé au contraire qu'avec un broyage plus sommaire, la quantité d'acides nucléiques mise en évidence dans la fraction acides nucléiques est plus forte, comme le montre le tableau III.

Temps de broyage (mn)	Nombre d'expériences	D.N.A	R.N.A
20	4	6,38	2,72
10	2	7,27	4,78

TABLEAU III. — Influence du temps de broyage.

Puisqu'un broyage assez long et énergique correspond à une diminution d'acides nucléiques, c'est sans doute qu'il provoque un accroissement de température qui favorise la dégradation des acides nucléiques en nucléotides et par suite leur entraînement dans la fraction acido-soluble.

d) L'échauffement peut être dû au broyage, mais le tissu lui-même, laissé à température ordinaire pendant un temps plus ou moins long permet sans doute l'hydrolyse des acides nucléiques.

e) Enfin l'extraction des acides nucléiques par l'ATC à 5 % à 90° pendant 15 minutes n'est peut-être pas totale. SCHNEIDER, dans l'exposé de sa méthode, précise bien que ce temps d'hydrolyse est suffisant pour une nucléohistone du thymus. Peut-être n'en est-il pas de même pour l'épithélium lingual bovin.

B. — Modifications de la méthode de Schneider.

C'est ainsi que les résultats peu satisfaisants de nos recherches antérieures nous ont conduits à reprendre une étude systématique de la méthode d'extraction, la méthode de SCHNEIDER

n'étant peut-être pas directement applicable au cas de l'épithélium lingual.

1. — PRÉPARATION D'UN TISSU STANDARD

Pour que les résultats soient comparables, les expériences ont été faites sur un même mélange d'épithélium de 4 langues de bovins. Le tissu prélevé et découpé au ciseau Frenkel a été lavé 5 fois par décantation avec du sérum physiologique à 4° ; puis le tissu a été recueilli sur filtre, essoré dans du papier filtre et refroidi à 0°.

Des fractions de 1,5 g de tissu ont été pesées aussitôt. Les unes ont été congelées rapidement à - 25°. Les autres ont été jetées dans un flacon contenant 25 ml d'éthanol à 95° à la température de - 25°. Enfin 4 fractions de 1,5 g ont été mises dans des creusets tarés puis portés à l'étuve à 105°, pendant 24 heures, pour la détermination du poids de tissu sec. Les poids ont été : 311,5 mg — 316 mg — 317,5 mg et 319,5 mg dont la moyenne est : 317,6 mg de substance sèche.

2. — EXPÉRIENCE A. FRACTIONNEMENT SCHNEIDER CLASSIQUE

Avec ce tissu standard un broyage à température ordinaire et un fractionnement ont été faits par la méthode classique de SCHNEIDER afin de servir de repère.

Résultats. — Les dosages colorimétriques du DNA et du RNA ont donné les résultats rapportés dans le tableau IV. Dans ce tableau, comme dans les tableaux suivants donnant des résul-

N°	Acido-Soluble		Acides Nucléiques		T O T A L	
	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
1	traces	12,0	0,38	1,2	0,38	13,2
2	traces	10,8	0,39	1,1	0,39	11,9

TABLEAU IV. — Exp. A : méthode Schneider classique.
DNA et RNA des différentes fractions.

tats de dosage de DNA et de RNA, les chiffres indiquent un nombre de γ par mg de substance sèche.

Par ailleurs des dosages de P total ont été effectués sur ces différentes fractions. Le tableau V rapporte les résultats obtenus, en même temps que le poids de P calculé d'après la teneur en P des acides nucléiques (9,6 % pour le DNA et 9,5 % pour le RNA) qui est indiqué par PAN.

N°	Acido-Soluble			Acides Nucléiques		
	P _{total}	P _{AN}	P _{minéral} : P _t - P _{AN}	P _{total}	P _{AN}	$\frac{P_t}{P_{AN}}$
1	1,87	1,14	0,73	0,126	0,151	0,84
2	1,80	1,02	0,78	0,142	0,146	0,97

TABLEAU V. — Exp. A : méthode Schneider classique.
P des différentes fractions.

Discussion. — 1. — Dans la fraction acides nucléiques, le rapport du P trouvé au P des acides nucléiques n'est qu'approximativement égal à 1. En effet les acides nucléiques de l'épithélium lingual n'ont sans doute pas la même constitution, et en particulier la même teneur en P, que les acides nucléiques qui nous servent de témoins. Comme le fait remarquer Y. MOULÉ [54], après bien d'autres, « le phosphore est le constituant le moins spécifique des acides nucléiques. La présence de métaphosphates liés aux protéines chez les levures et l'existence d'esters phosphoriques non encore totalement identifiés mais distincts des acides ribonucléiques dans certains tissus animaux en sont des preuves manifestes ».

2. — La quantité de P des nucléotides dans la fraction acido-soluble est nettement inférieure à la quantité de P trouvé : la différence, 0,75 γ par mg, représente le phosphore minéral des cellules.

3. — Plus étonnante est la très faible quantité de DNA trouvé, moins de 0,4 γ par mg de substance sèche, alors que la quantité de RNA et de nucléotides à ribose est de l'ordre de 12 γ , c'est-à-dire 30 fois plus forte. Il faut supposer qu'une partie du DNA échappe à l'action des réactifs.

4. — La quantité de RNA de la fraction acido-soluble est presque 10 fois plus forte que celle de la fraction acides nucléiques. Il semble donc que, dans la fraction acido-soluble, on dose non seulement les nucléotides ou petits polynucléotides existant dans les cellules, mais encore des produits de dégradation des acides nucléiques. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle les acides nucléiques sont en partie hydrolysés soit sous l'action des enzymes tissulaires libérés par le broyage, soit à cause de l'élévation de température au cours du broyage, soit enfin par l'ATC à 10 %.

3. — EXPÉRIENCE B. MÉTHODE DE SCHNEIDER MODIFIÉE

Nous avons donc essayé :

1° de prendre plus de précautions pour maintenir constamment le tissu à une température voisine de 0° ;

2° d'éviter un trop fort pourcentage d'ATC.

Expérience B1. Condition de température. — Dans 3 expériences, le tissu a donc été broyé pendant 3 minutes dans un mortier préalablement porté à 0° avec 0,5 g de quartz, mais en maintenant le tissu humide pour éviter l'échauffement local dû à un broyage à sec.

Le reste des opérations a été conduit comme dans la méthode de SCHNEIDER. Les résultats portés dans le tableau VI montrent que la quantité de RNA trouvé dans la fraction acido-soluble est plus faible que précédemment : 76 % du RNA total au lieu de 91 %. Ceci montre l'importance de l'hydrolyse des acides nucléiques due à l'accroissement de température.

Expérience B2. Concentration de l'ATC. — Dans 2 autres expériences, le tissu étant traité avec les précautions de froid précédentes, les protéines sont précipitées par de l'ATC à 10 % en volume égal à celui du broyat. La concentration finale en ATC est donc de 5 %. Après centrifugation, le culot est repris avec de l'ATC à 5 %.

La quantité de RNA trouvé dans la fraction acido-soluble est sensiblement la même que précédemment : 77 % du RNA total.

EXPERIENCE	N°	Acido-Soluble		Acides Nucléiques		T O T A L	
		D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
B ₁	3	traces	7,9	0,63	2,5	0,63	10,4
	4	"	7,4	0,57	2,6	0,57	10,0
	5	"	7,5	0,44	2,0	0,44	9,5
B ₂	6	traces	5,6	0,79	1,9	0,79	7,5
	7	"	6,0	0,54	1,5	0,54	7,5

TABLEAU VI. — Exp. B : méthode de Schneider modifiée.
DNA et RNA des différentes fractions.

CONCLUSION. — Ces 2 séries d'expériences montrent que la dégradation des acides nucléiques dépend moins de la concentration en ATC que des conditions de température.

Il n'en reste pas moins que la quantité de produits de dégradation d'acide ribose nucléique dans la fraction acido-soluble reste importante par rapport à la quantité totale d'acide ribose nucléique : 76 à 77 %.

C. — Mise au point d'une nouvelle méthode.

Il s'avère donc nécessaire :

1° d'éviter toute hydrolyse due aux enzymes du tissu et par conséquent d'empêcher leur action ;

2° d'éviter toute cause d'échauffement du tissu et en particulier de procéder à un broyage rapide mais pourtant suffisant ;

3° de limiter l'action de l'ATC froid à l'extraction des substances acido-solubles.

C'est pourquoi nous avons pensé coaguler les protéines, non par l'ATC, mais par l'éthanol à 95 à une température de - 25°. En même temps, l'éthanol bloque toute action enzymatique. Ainsi, le triple but que nous nous proposons peut être atteint.

Le tissu est donc projeté aussitôt après pesée dans l'alcool à 95 préalablement porté à - 25°. Au moment du broyage, l'alcool est décanté et le broyage est effectué avec 0,5 g. de quartz, dans un mortier lui-même porté à - 25° ; 4 à 5 minutes suffisent

alors pour une désintégration complète des cellules. Le broyat est repris en 3 ou 4 fois par l'alcool décanté de façon à rincer le mortier, et les différentes parties sont versées successivement dans le tube de centrifugeuse.

Après centrifugation, des dosages de DISCHE et de MEJBAUM faits sur cette fraction alcool, directement ou après élimination de l'alcool et reprise par l'eau, ont prouvé l'absence de DNA et de RNA.

EXPÉRIENCE C1

Après extraction des phospholipides par le mélange alcool-éther bouillant, comme dans la méthode de SCHNEIDER, le culot est lavé avec un mélange éthanol à 95 - eau à volumes égaux dans le but d'éliminer les nucléotides présents et de passer de la phase étherée à la phase aqueuse. Cette fraction éthanol-eau, amenée à 10 ml, renferme d'appréciables quantités de nucléotides à ribose (tableau VII) en moyenne 2,22 γ par mg.

Le culot de centrifugation est repris par de l'ATC à 10 % froid qui, à son tour, enlève une quantité moyenne de 0,86 γ de RNA.

L'extraction des acides nucléiques est alors faite par l'ATC à 5 % à 90° pendant 15 minutes selon la méthode de SCHNEIDER.

Résultats et discussion. — Que remarquons-nous dans le tableau VII qui rend compte de cette expérience ?

1. — La quantité de DNA trouvé est environ 10 fois plus forte que dans la méthode de SCHNEIDER. Pourquoi, dans la méthode de SCHNEIDER, une grande partie du DNA échappait-il au fractionnement ? Lorsqu'on coagule les protéines avec de l'ATC,

No	ACIDO - SOLUBLE						ACIDES NUCLEIQUES		T O T A L des COMPOSES NUCLEIQUES	
	Fraction ATC		Ethanol-eau		T O T A L					
	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
8	traces	0,88	traces	2,20	traces	3,08	5,26	7,55	5,26	10,63
9	"	0,83	"	2,42	"	3,25	5,30	8,15	5,30	11,40
10	"	0,88	"	2,05	"	2,93	4,38	7,65	4,38	10,58

TABLEAU VII. — Expérience C1 : DNA et RNA des différentes fractions.

le précipité est compact, difficile à reprendre. Avec l'éthanol, l'aspect du précipité est bien différent : il est poudreux, fin et facile à remettre en suspension. On peut penser que le DNA qui se trouve surtout dans le noyau des cellules est difficilement attaqué quand le précipité de protéines est trop compact.

2. — En ce qui concerne le RNA, la quantité trouvée dans la fraction acido-soluble (fraction ATC froid augmentée de la fraction éthanol-eau) reste bien inférieure à la quantité de RNA de la fraction acido-soluble dans la méthode de SCHNEIDER : en moyenne 28 % du RNA total au lieu de 76 %. Ce qui prouve que les acides nucléiques du broyat ont été mieux protégés de l'hydrolyse.

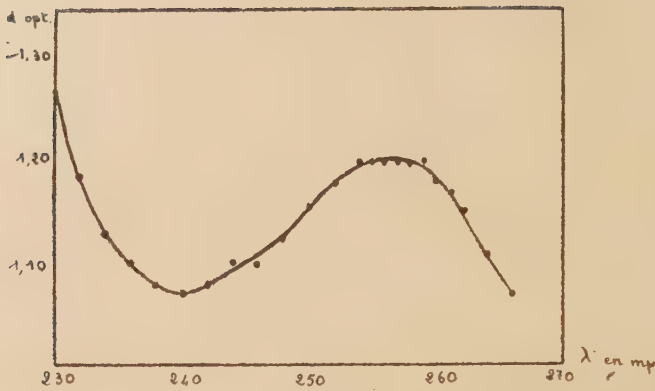
3. — Les remarques faites à propos des dosages de P sur les fractions extraites par la méthode de SCHNEIDER restent valables à condition de considérer pour le P minéral la somme des fractions ATC froid et éthanol-eau (tableau VIII).

N°	ACIDO - SOLUBLE							ACIDES NUCLEIQUES		
	A.T.C froid		Ethanol-eau		T O T A L					
	P _t	P _{AN}	P _t	P _{AN}	P _t	P _{AN}	P miné- ral	P _t	P _{AN}	P _t /P _{AN}
8		0,08	0,54	0,21		0,29		1,27	1,22	1,04
9	0,36	0,08	0,56	0,23	0,92	0,31	0,61	1,29	1,28	1,00
10	0,39	0,08	0,54	0,20	0,93	0,29	0,65	1,22	1,15	1,05

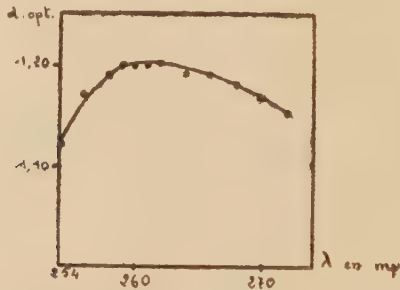
TABLEAU VIII. — Exp. C1 : P des différentes fractions.

4. — La réaction de MEJBAUM étant positive avec la fraction éthanol-eau, nous avons vérifié que cette réaction qui révèle le ribose est bien due à la présence d'acides nucléiques ou de nucléotides par l'absorption dans l'ultra-violet à l'aide du spectrophotomètre Beckmann. On sait que les acides nucléiques absorbent les rayons ultra-violet dans la région de 260 m μ , absorption due au système de doubles liaisons conjuguées des noyaux puriques et pyrimidiques. La courbe d'absorption (courbe I) de la fraction éthanol-eau présente bien un maximum entre 254 et 259 m μ .

Les fractions acides nucléiques étendues au 1/10, et donc en solution dans l'ATC à 1 %, présentent aussi un maximum d'absorption vers 259 à 264 m μ (courbe II).



Courbe I. — Absorption dans l'ultra-violet de la fraction éthanol-eau n° 8 étendue au 1/2 avec le mélange éthanol-eau contre le mélange éthanol-eau.



Courbe II. — Absorption dans l'ultra-violet de la fraction acides nucléiques n° 8 diluée au 1/10, contre l'ATC à 1 %

EXPÉRIENCE C2

Sans doute les quantités d'acides nucléiques extraites par cette nouvelle méthode sont beaucoup plus importantes que par la méthode de SCHNEIDER, mais cette extraction est-elle totale ?

Les culots de centrifugation, provenant d'une série de 6 expériences :

2 par la méthode de SCHNEIDER modifiée ;

4 par la méthode nouvelle,

ont été repris, broyés à nouveau avec du quartz puis soumis à une 2^e hydrolyse par l'ATC à 5 % à 90° pendant 15 minutes. D'importantes quantités de DNA et de RNA ont été encore libérées (tableau IX).

Les culots de centrifugation ont été repris une 3^e et une 4^e fois avec hydrolyse trichloracétique à 90° pendant 15 minutes.

Ce n'est que la 5^e fois que l'on peut considérer les quantités extraites comme négligeables et d'ailleurs trop faibles pour être dosées.

Il est tout à fait intéressant de noter que dans ces échantillons de tissus traités de façons différentes, la somme des quantités de DNA et RNA est sensiblement la même, ce qui tend à prouver que l'extraction est totale.

Le tableau IX montre aussi la nécessité d'une extraction de la fraction acido-soluble par l'ATC. En effet, nous pensions qu'après extraction des lipides, un lavage par le mélange éthanol-eau était peut-être suffisant pour enlever les nucléotides présents. Afin de déterminer la quantité d'ATC à 5 % froid nécessaire à l'extraction de l'acido-soluble, les 4 échantillons 11, 12, 13 et 14 ont été traités respectivement par 0, 1, 2 et 3 fois 25 ml d'ATC. Or si les 2^e et 3^e rinçages des échantillons 13 et 14 ne comportent pas de traces de DNA et RNA, un rinçage au moins paraît nécessaire pour permettre la suite des opérations puisque 2,24 γ de RNA au lieu de 9,41 sont extraits au cours de la 1^{re} hydrolyse trichloracétique dans l'échantillon 11. Il est vrai qu'au cours de la 2^e et 3^e hydrolyse, le reste de RNA est extrait. On peut penser qu'un lavage à l'ATC froid élimine des substances acido-solubles gênant l'hydrolyse des acides nucléiques, et surtout commence l'hydrolyse des liaisons les plus fragiles des acides nucléiques.

EXPÉRIENCE C3

Ainsi 4 extractions de 15 minutes par l'ATC à 5 % à 90° se sont avérées nécessaires pour hydrolyser les acides nucléiques et permettre de les doser. Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons cherché à déterminer le temps minimum nécessaire pour hydrolyser en une seule fois. Les expériences ont été faites en double. Les opérations sont conduites de la même façon que précédemment, mais le temps d'hydrolyse trichloracétique est de 1 h., 1 h. 30 mn. ou 2 h.

Le tableau X montre que les quantités trouvées sont sensiblement les mêmes et qu'un temps d'hydrolyse de 1 heure est donc suffisant. Les culots de centrifugation d'ailleurs ont été repris par 10 ml d'ATC à 5 % et soumis à 90° pendant 30

N°	Exp.	Nombre d'extractions de l'acido-soluble.	D				N				R				A			
			Extractions successives 15 mn à 90°				Extractions successives 15 mn à 90°				Extractions successives 15 mn à 90°				Extractions successives 15 mn à 90°			
			Acido - soluble + Ethanol - eau	1ère	2ème	3ème	4ème	TOTAL	Fraction Acido - Soluble	Fraction Ethanol - eau	Total	1ère	2ème	3ème	4ème	Total	TOTAL	
6	B ₂		Traces non dosables	0,79	2,70	2,30	1,36	7,15	5,63	-	5,63	1,85	3,73	1,90	0,91	8,39	14,02	
7	B ₂		"	0,54	2,50	2,52	1,36	6,92	6,05	-	6,05	1,54	3,66	1,86	0,80	7,86	13,91	
11	C ₂	0	"	0,79	2,92	2,06	1,19	6,96	-	2,42	2,42	2,24	5,12	2,75	1,05	11,16	13,58	
12	C ₂	1	"	4,06	1,70	0,94	0,57	7,27	0,35	2,26	2,61	9,41	1,03	0,84	0,50	11,78	14,39	
13	C ₂	2	"	4,25	1,56	0,96	0,74	7,51	0,25	2,42	2,67	9,41	1,04	0,64	0,29	11,38	14,05	
14	C ₂	3	"	4,13	1,70	0,96	0,57	7,36	0,30	2,42	2,72	8,77	0,92	0,56	0,44	10,69	13,41	

TABLEAU IX. — Acides nucléiques extraits par plusieurs hydrolyses successives de 15 mn à 90°.

minutes. Les quantités de DNA ou RNA trouvées sont alors négligeables : 1 à 3 %. Enfin ces culots ont été repris une 2^e fois les uns après broyage, les autres tels quels. Cette fois encore les quantités de DNA et RNA sont négligeables.

N°	Temps d'extraction en mn	Acides Nucléiques	
		D.N.A	R.N.A
15	60	6,15	12
16	60	6,15	11,80
17	90	5,35	12,20
18	90	5,50	12,20
19	120	5,20	12,50
20	120	5,15	12

TABLEAU X. — Exp. C3 : DNA et RNA
extraits suivant le temps d'hydrolyse.

EXPÉRIENCE C4

Enfin dans le but de simplifier la méthode nous avons essayé de supprimer la fraction éthanol-eau. En effet, d'une part, dans le mélange éthanol-eau les centrifugations sont difficiles ; le précipité reste poudreux et la décantation du surnageant exige beaucoup de soin. D'autre part, le dosage de DNA et RNA exigerait des témoins préparés dans les mêmes conditions, surtout en raison des bains-marie qui provoquent l'évaporation de l'alcool.

Ces difficultés pratiques nous ont incités à extraire les nucléotides seulement par de l'ATC à 5 % froid. Les résultats rapportés dans le tableau XI sont très comparables aux résultats précédents (voir tableau XIII) et nous ont fait adopter ce procédé.

Des dosages de P sur ces 2 expériences sont en parfait accord avec les résultats trouvés par la méthode de SCHNEIDER. On constate en effet que le poids de phosphore minéral est approximativement 0,75 γ par mg de substance sèche, comme nous l'avions trouvé par la méthode de SCHNEIDER (cf. tableau V) et au cours de l'expérience C1 (0,63 γ d'après le tableau VIII).

N°	Acido-Soluble		Acides Nucléiques		T O T A L	
	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
21	0,25	2,78	5,78	11,50	6,03	14,28
22	0,25	2,78	5,58	11,50	5,83	14,28

TABLEAU XI. — Exp. C4 : DNA et RNA des différentes fractions.

De même le rapport du P trouvé par la méthode de MACHEBŒUF et DELSAL au P calculé à partir des acides nucléiques est très proche de 1 dans la fraction acides nucléiques (tableau XII).

N°	ACIDO-SOLUBLE			ACIDES NUCLEIQUES		
	P _t	P _{AN}	P _{minéral}	P _t	P _{AN}	P _t /P _{AN}
21	1,07	0,29	0,78	1,56	1,65	0,945
22	1,04	0,29	0,75	1,60	1,63	0,985

TABLEAU XII. — Exp. C4 : P des différentes fractions.

D. — Confrontation de tous les résultats.

Les résultats obtenus par ces différentes méthodes sont résumés et comparés dans le tableau XIII.

Au fur et à mesure de la mise au point de la technique, les résultats tendent vers des valeurs relativement constantes.

Si la méthode C2 semble donner un taux de DNA supérieur à celui de la méthode C3 ou C4, c'est qu'elle a comporté 4 hydrolyses de 15 minutes et 4 dosages partiels d'acides nucléiques, tandis que C3 et C4 comportent une hydrolyse de 60 minutes et un seul dosage d'acides nucléiques. Le chiffre de DNA obtenu en C2 est probablement faussé parce qu'il résulte de l'addition de 4 résultats partiels très faibles.

Il reste cependant vrai que le DNA est plus difficile à solubi-

Exp.	Nombre d'exp.	Broyage	ACIDO - SOLUBLE										ACIDES NUCLEIQUES					TOTAL			% R.N.A dans Acido-Soluble
			C Cl ₃ COO H (A.T.C)			Ethanol- eau			Total		Volume en ml	Temps B.M. 90° en mn	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A			
			Concentration d'ATC	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A											
A	2	15 mn à température ordinaire.	10 %	traces	11,40				traces	11,40	10	15	0,38	1,15	0,38	12,55			91		
B ₁	3	3 mn à 0°	10 %	traces	7,60				traces	7,60	10	15	0,54	2,40	0,54	10,00			76		
B ₂	2	3 mn à 0°	5 %	"	5,80				"	5,80	10	15	0,66	1,70	0,66	7,50			77,50		
C ₁	3	4 mn dans l'alcool à - 25°	10 %	traces	0,86	0,25	2,22		0,25	3,08	10	15	4,98	7,78	4,98	10,86			28		
C ₂	4	"	5 %	"	0,30	0,25	2,38		0,25	2,68	50	4 x 15	7,30	11,25	7,38	13,93			19		
C ₃	6	"	5 %	"	0,30	0,25	2,38		0,25	2,68	50	60	5,58	12,10	5,83	14,78			18		
C ₄	2	4 mn dans l'alcool à - 25°	5 %	traces	2,78				traces	2,78	30	60	5,67	11,50	5,92	14,28			19,50		

TABLEAU XIII. — Résultats moyens des différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques.

liser que le RNA. Au cours de l'essai C2, les quantités extraites par les 4 hydrolyses successives représentent respectivement en % de l'acide total :

pour le DNA : 56, 23, 13 et 8 % ;

pour le RNA : 80, 9, 7 et 4 %.

Ce fait s'explique par la répartition des 2 acides nucléiques dans la cellule : le RNA se trouve surtout dans le cytoplasme, il est ainsi facilement libéré dès la rupture de la membrane cellulaire ; au contraire, le DNA est concentré dans le noyau, petite particule difficile à désintégrer.

Si nous adoptons les chiffres trouvés au cours de l'expérience C4 pour laquelle tous les dosages ont été faits en double en donnant des chiffres identiques ou très voisins, on constate que le

rapport : $\frac{\text{RNA}}{\text{DNA}} = \frac{14,28}{5,92} = 2,42$. Ce chiffre est bien de

l'ordre de grandeur de ce rapport dans les tissus.

Par ailleurs au cours des expériences C2, C3 et C4 pour lesquelles on peut considérer que l'extraction des acides nucléiques est totale et que ceux-ci n'ont pas été dégradés au cours du broyage, la proportion de RNA de l'acido-soluble est de 18 à 20 % du RNA total.

La technique de dosage finalement adoptée (C4) permet donc un dosage suffisamment exact des acides nucléiques et de leurs produits de dégradation dans l'épithélium lingual bovin, et probablement dans n'importe quel tissu difficile à broyer [39].

E. — Méthode adoptée.

Le tissu (1,5 g), ayant été jeté dans 25 ml d'éthanol à 95° à température de -25° (température maintenue dans un congélateur), est broyé avec 0,5 g de quartz dans un mortier refroidi à -25°, et le broyat repris par l'alcool décanté pour être versé dans le tube de centrifugeuse.

Après centrifugation et élimination du surnageant, les phospholipides sont éliminés par ébullition pendant 3 minutes avec 10 ml du mélange alcool-éther (3 vol. - 1 vol.) et centrifugation de 15 minutes. Cette opération est répétée une 2^e fois.

Ensuite l'extraction de l'acido-soluble se fait par 10 ml, puis

9 ml d'ATC à 5 % refroidi à 2°. Les deux surnageants sont réunis et leur volume amené à 20 ml par de l'ATC à 5 % froid.

Enfin les acides nucléiques sont extraits par 25 ml mesurés avec précision d'ATC à 5 % au bain-marie à 90° pendant 1 heure. Après centrifugation, un rinçage du culot est fait avec 5 ml exactement d'ATC à 5 % froid. Les deux surnageants sont réunis dans un ballon jaugé de 30 ml. Le volume total est inférieur à 30 ml parce qu'il y a une évaporation importante au cours du chauffage au bain-marie. On rétablit le volume de 30 ml à l'aide de l'eau distillée en maintenant ainsi une concentration d'ATC de 5 %.

Le dosage de DNA est fait sur 2 ml des fractions acido-solubles et acides nucléiques préalablement filtrées, et le dosage de RNA sur 1 ml de ces mêmes solutions, en utilisant comme témoins des solutions titrées de DNA et RNA dans l'ATC à 5 % ayant subi la même hydrolyse de 1 heure à 90°.

TROISIÈME PARTIE

LES ACIDES NUCLEIQUES AU COURS DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS APHTEUX

La méthode mise au point a été appliquée à des prélèvements d'épithélium lingual mis en culture au cours de la multiplication du virus aphteux.

Des cultures prolongées de 72 heures ont été expérimentées à l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse pour étudier le développement du virus et le temps optimum de culture. Ces cultures expérimentales ont donné lieu à des mesures précises d'infectivité, de fixation du complément pour le virus et du pouvoir d'oxydo-réduction du tissu. Corrélativement, nous avons cherché les variations d'acides nucléiques au cours de ces cultures.

D'autre part, ces cultures prolongées ayant mis en évidence l'importance du début de l'infection virale, nous avons étudié les variations d'acides nucléiques au début de la culture virulente.

CHAPITRE VI

CULTURES PROLONGEES

Deux cultures prolongées ont été faites selon la méthode décrite précédemment. Chaque expérience s'étendait sur deux semaines environ : 3 jours pleins pour la culture, 3 à 6 jours pour les fractionnements suivant que les prélèvements étaient faits en simple ou en double, 2 jours pour les dosages d'acides nucléiques. La mesure de fixation du complément a été faite avec l'équipe de sérologie de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse qui a assuré les mesures d'infectivité.

La 1^{re} culture a étéensemencée avec du virus C titrant :

$10^{-5,5}$ pour l'infectivité

0,395 pour la fixation du complément.

La 2^e culture a étéensemencée avec du virus O titrant :

$10^{-6,0}$ pour l'infectivité

0,840 pour la fixation du complément.

A. — Expériences.

On prélève du tissu au moment de la mise en culture puis après 5 h., 10 h., 15 h., 20 h., 25 h., 30 h., 40 h. et 50 heures de culture.

Une culture témoin est faite parallèlement dans les mêmes conditions. Dans la 1^{re} expérience (C), la culture témoin a été faite simplement en mettant le tissu dans le milieu nutritif de culture ; dans la 2^e expérience (O), la culture témoin a étéensemencée avec du virus inactivé par chauffage à 56° pendant 1 heure. Au cours de ce chauffage, le virus aphteux perd sa virulence mais non pas ses propriétés de fixation du complément.

Aussitôt après le prélèvement, une partie du tissu est pesé puis broyé, et le broyat repris par du liquide surnageant à raison de 7 ml de liquide de culture par gramme de tissu. L'homogénéisat qui en résulte est centrifugé pendant 10 minutes avec une force de 1.200 g (2.400 tours à la minute) pour éliminer le quartz et les fragments de tissu, puis le surnageant est soumis à une filtration stérilisante sous faible pression (150 grammes). Le filtrat limpide conservé à 4° sert à faire les mesures d'infectivité et de fixation du complément.

Le reste du tissu est lavé 4 fois avec du sérum physiologique froid, essoré et pesé en 4 fractions de 1,5 g : la 1^{re} et la 4^e sont placées dans des creusets préalablement tarés pour obtenir le poids de substance sèche, et la 2^e et la 3^e jetées dans 25 ml d'éthanol à - 25°.

Dans la culture C, le fractionnement des composés phosphorés en vue de l'extraction des acides nucléiques a été fait en double pour chaque prélèvement ; les dosages d'acides nucléiques ont eux-mêmes été effectués en double, si bien que les résultats obtenus représentent la moyenne de 4 chiffres. Les chiffres extrêmes donnent un écart qui est au maximum de 7 %. Comme les chiffres obtenus avec les prélèvements en double de l'expérience C étaient très voisins, au cours de la culture O, les acides nucléiques ont été extraits sur un seul prélèvement, mais les dosages colorimétriques d'acides nucléiques ont été faits en double.

B. — Résultats.

Les résultats sont donnés par les tableaux I et II illustrés par les courbes I et II (p. 72 et 73).

1. — *Relation entre acides nucléiques et multiplication du virus.*

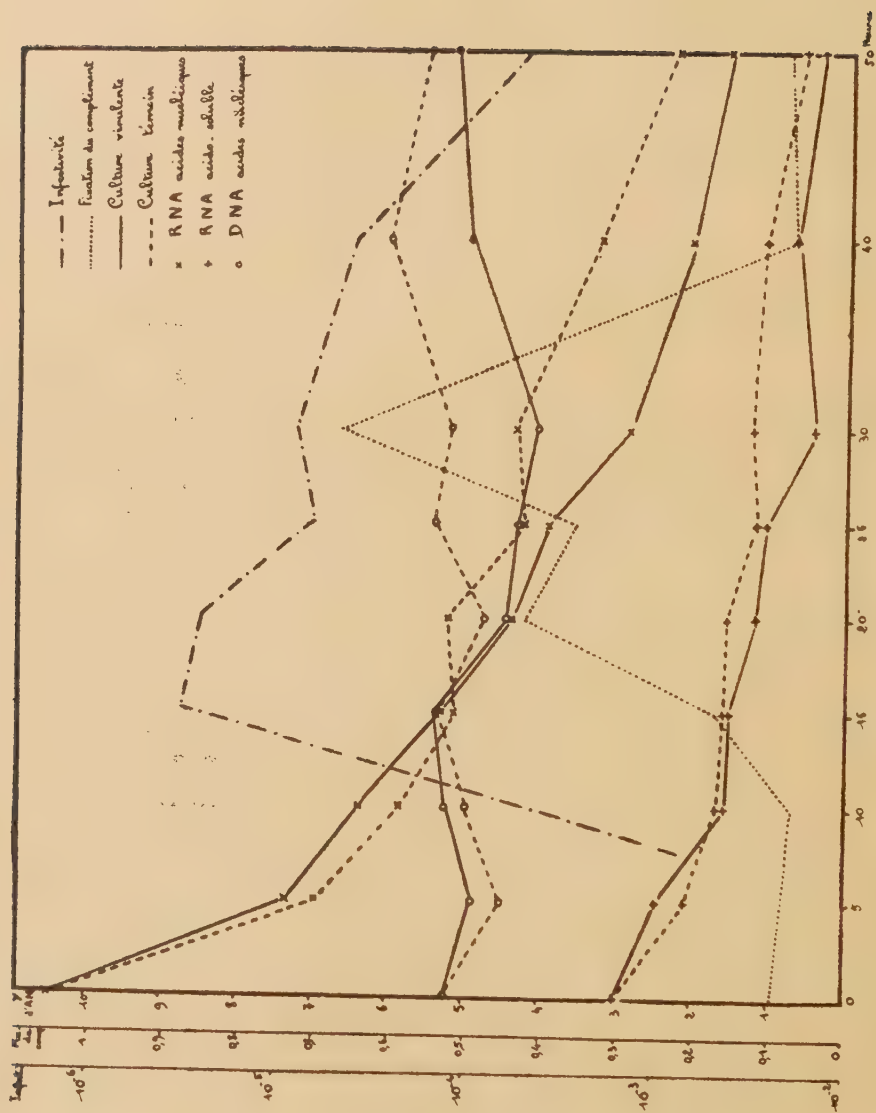
La présence et le développement du virus sont mis en évidence par l'infectivité de la culture virulente et le pouvoir de fixation du complément. Les courbes représentatives de ces deux aspects du développement viral offrent un certain parallélisme :

CULTURE VIRULENTS				CULTURE TENDON			
Heure de prélèvement	Infectivité	Fixation du Complément	Acido-Soluble		Acides Nucléiques		Heure de prélèvement
			D.N.A.	R.N.A.	D.N.A.	R.N.A.	
0	0	0,095	0,21	3,00	5,22	10,50	0
5	0	0,080	0	2,48	4,87	7,35	5
10	$10^{-3,7}$	0,070	0	1,61	5,26	6,40	10
15	$10^{-5,5}$	0,170	0	1,55	5,30	5,30	15
20	$10^{-5,4}$	0,420	0	1,20	4,46	4,40	20
25	$10^{-4,8}$	0,350	0	1,08	4,28	3,93	25
30	$10^{-4,9}$	0,660	0	0,45	4,08	2,86	30
40	$10^{-4,6}$	0,070	0	0,69	4,98	2,08	40
50	$10^{-3,7}$	0,085	0	0,38	5,20	1,60	50

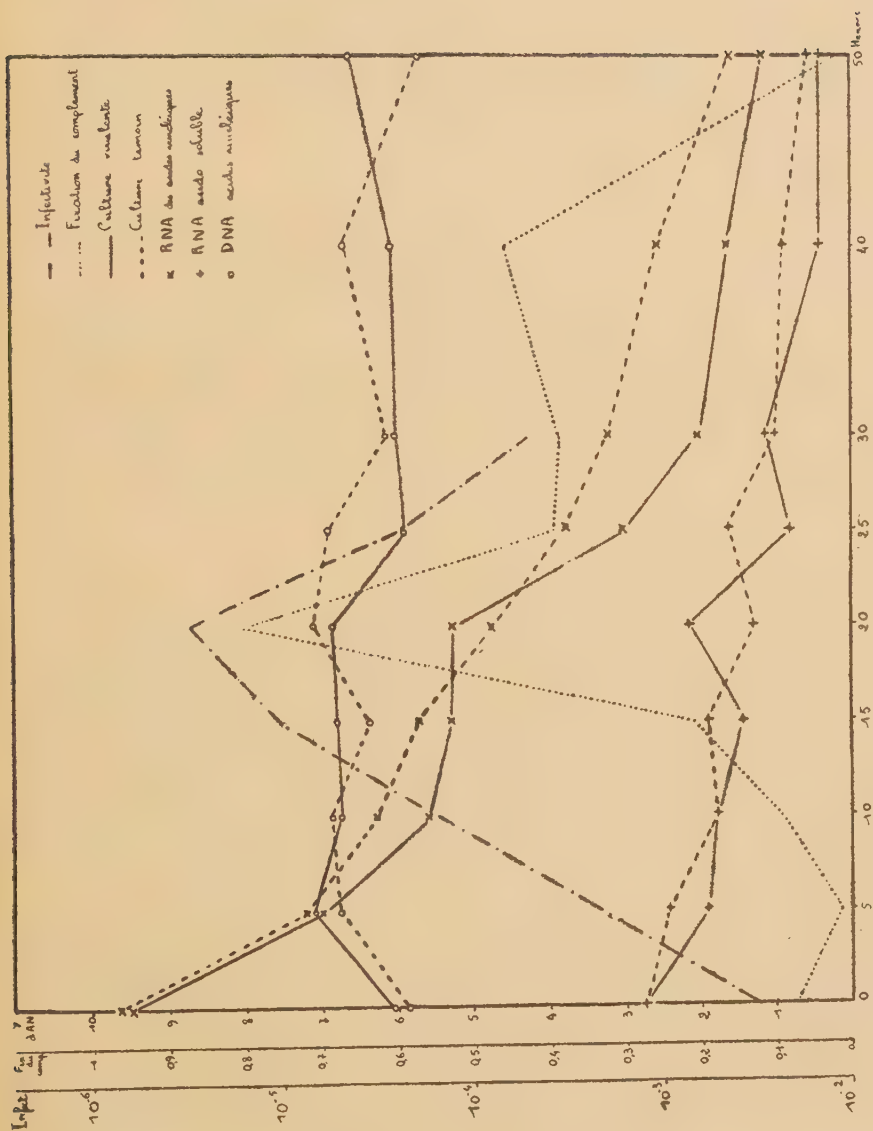
TABLEAU I. — Culture C.

CULTURE VIRULENTS				CULTURE TENDON			
Heure de prélèvement	Infectivité	Fixation du Complément	Acido-Soluble		Acides Nucléiques		Heure de prélèvement
			D.N.A.	R.N.A.	D.N.A.	R.N.A.	
1/4	$\leq 10^{-2,5}$	0,070	0	2,76	6,00	9,50	1/4
5	?	0,015	0	1,91	7,10	6,96	5
10	$10^{-4,2}$	0,095	0	1,78	6,75	5,57	10
15	10^{-5}	0,210	0	1,45	6,78	5,31	15
20	$10^{-5,5}$	0,805	0	2,17	6,86	5,31	20
25	$10^{-4,4}$	0,395	0	0,80	5,88	3,00	25
30	$10^{-3,7}$	0,385	0	1,10	6,01	2,01	30
40	?	0,455	0	0,40	6,04	1,60	40
50	?	0,020	0	0,40	6,60	1,14	50

TABLEAU II. — Culture O.



Courbe I. — Culture C.



Courbe II. — Culture O.

CHAPITRE VII

DEBUT DE CULTURE

Certains faits nous ont incités à étudier de façon plus précise le comportement des acides nucléiques au début de la culture :

1° La chute brusque de RNA, qui, au cours des 5 premières heures des 2 cultures expérimentales précédentes, a été de l'ordre de 30 %, paraît importante à un moment où le tissu, prélevé depuis peu de temps et placé dans un milieu nutritif, doit conserver encore une grande vitalité.

2° Si après 5 heures de culture, la virulence et la propriété de fixation du complément sont très faibles et quelquefois nulles, on a constaté que cette chute de la virulence et de la fixation du complément se produit très rapidement. Ainsi, la culture expérimentale C a étéensemencée avec un virus dont le titre de virulence est $10^{-5.5}$. La mise en culture le dilue au 1/10, si bien que sa virulence au départ est $10^{-4.5}$. Or cette infectivité s'est révélée sensiblement nulle lors d'un titrage d'infectivité fait au moment considéré comme le début de la culture (et que nous avons appelé temps 0), c'est-à-dire à peu près 30 minutes après l'ensemencement, temps nécessaire pour que les erlens de culture prennent la température de 37°. Un phénomène analogue se produit pour la fixation du complément.

Cette quasi disparition des propriétés d'infectivité et de fixation du complément suggère un rapprochement avec la période éclipse chez les phages. Ce début de la culture qui coïncide avec la pénétration du virus dans le tissu nous a paru présenter un intérêt particulier.

A. — Expériences.

3 expériences ont été faites en se servant du même virus d'inoculation, virus de souche O particulièrement actif :

titre d'infectivité : 10^{-6}

pouvoir de fixation du complément : 0,840.

Expérience I

Cette culture a été faite à la température ordinaire dans des erlens contenant chacun 20 g de tissu découpé et 135 ml de milieu nutritif. La culture virulente a étéensemencée par 15 ml de virus et la culture témoin correspondante par 15 ml de virus inactivé par chauffage à 56° pendant 1 heure.

Il y a autant d'erlens virulents et témoins que de prélèvements qui ont été faits après 15 mn, 30 mn, 45 mn et 67 mn.

Comme pour les cultures prolongées, une partie du tissu est prélevée pour l'extraction et le dosage des acides nucléiques, et l'autre partie est utilisée pour préparer, dans le cas des cultures virulentes, le liquide qui servira à la mesure de fixation du complément. Les dosages d'acides nucléiques ont été faits en double.

Expérience II

Le même processus a été employé, mais la température a été maintenue à 37° et les prélèvements ont été faits après 20 mn, 40 mn, 60 mn, 90 mn et 120 mn. En outre, le tissu initial a été soumis au fractionnement. Les prélèvements en vue de l'extraction des acides nucléiques après 20 mn (V 20 et T 20) et après 40 mn (V 40 et T 40) ont été faits en double. Les dosages d'acides nucléiques ayant été effectués en double, les valeurs indiquées pour ces prélèvements représentent la moyenne de 4 chiffres.

Dans cette expérience, la fixation du complément n'a pas été déterminée de façon quantitative, mais une détermination qualitative a montré qu'elle est très faible et sensiblement nulle pour tous les prélèvements.

Expérience III

La même technique a été employée, mais la culture témoin n'a pas été ensemencée avec du virus inactivé.

En outre, un erlen témoin contenant 20 g de tissu découpé et 150 ml de milieu de culture a été mis à 4° pendant 120 mn ; il est désigné par « tissu froid » dans le tableau III.

B. — Résultats.

Les résultats sont donnés par les tableaux I, II, III et illustrés par les courbes I, II, III correspondant aux 3 expériences.

1. — Fixation du complément.

Au cours de l'expérience I, le pouvoir de fixation du complément décroît très rapidement. La fixation du complément du virus d'ensemencement est 0,840 ; dilué au 1/10, le calcul prouve qu'elle devient égale à 0,202. Or après 45 minutes, le pouvoir de fixation du complément est à peine le dixième de ce qu'il était au début de l'infection.

2. — Variations du DNA.

Le DNA, nul dans la fraction acido-soluble, présente de faibles variations paraissant non significatives dans la fraction acides nucléiques.

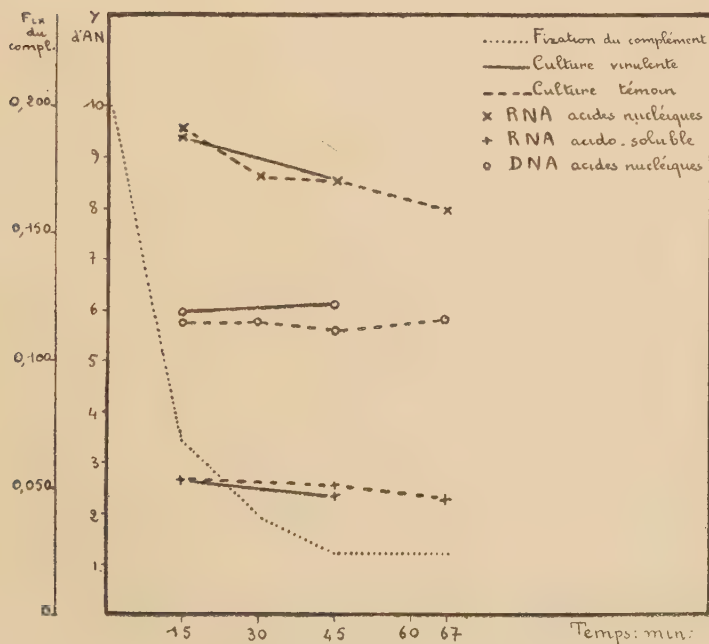
3. — Variations du RNA.

a) Le RNA de la fraction acido-soluble présente une décroissance importante, approximativement la même dans la culture virulente et dans la culture témoin : en moyenne 30 % (tableau IV).

b) Le RNA de la fraction acides nucléiques des cultures témoins et virulentes subit une décroissance encore plus importante : en moyenne 36 % (tableau IV).

CULTURE VIRULENTE						CULTURE TÊMOIN				
Prélèvement mn	Fixation du Complément	ACIDO-SOLUBLE		ACIDES NUCLEIQUES		Prélèvement mn	ACIDO-SOLUBLE		ACIDES NUCLEIQUES	
		D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A		D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
0	0,202	0								
15	0,070	0	2,76	6,00	9,50	15	0	2,70	5,85	9,60
30	0,040	0				30	0	2,54	5,86	8,75
45	0,025	0	2,48	6,18	8,58	45	0	2,53	5,68	8,58
67	0,025	0				67	0	2,34	5,91	8,06

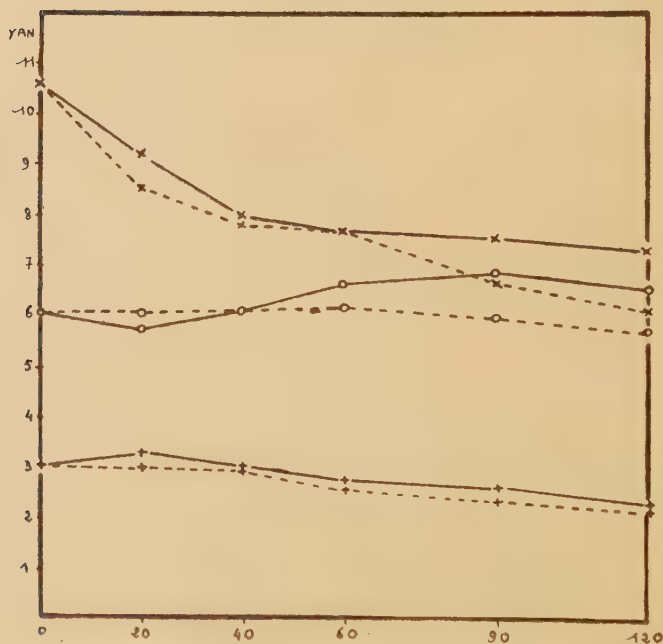
TABLEAU I. — Expérience I.



Courbe I. — Expérience I.

CULTURE VIRULENTE					CULTURE TEMOIN				
Prélè- vement mn	ACIDO-SOLUBLE		ACIDES NUCLEIQUES		Prélè- vement mn	ACIDO-SOLUBLE		ACIDES NUCLEIQUES	
	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A		D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
0	0	3,04	6,07	10,6	0	0	3,04	6,07	10,6
20	0	3,28	5,75	9,22	20	0	2,99	6,03	8,50
40	0	2,98	6,08	7,77	40	0	2,92	6,21	7,95
60	0	2,76	6,65	7,67	60	0	2,62	6,15	7,68
90	0	2,62	6,88	7,55	90	0	2,35	5,93	6,71
120	0	2,30	6,53	7,30	120	0	2,19	5,67	6,11

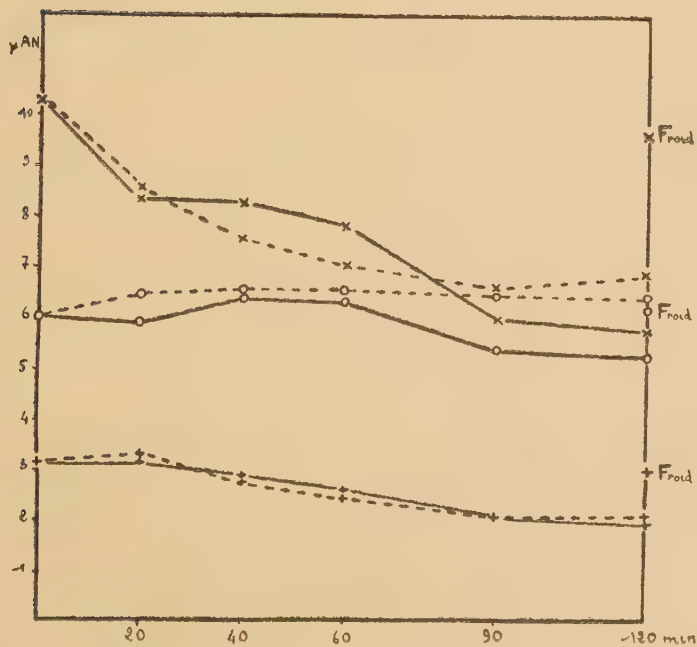
TABLEAU II. — Expérience II.



Courbe II. — Expérience II.
(Légende : voir courbe I, p. 77)

CULTURE VIRULENTE					CULTURE TEMOIN				
Prélèvement mn	ACIDO-SOLUBLE		ACIDES NUCLEIQUES		Prélèvement mn	ACIDO-SOLUBLE		ACIDES NUCLEIQUES	
	D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A		D.N.A	R.N.A	D.N.A	R.N.A
0	0	3,17	6,06	10,25	0	0	3,17	6,06	10,25
20	0	3,20	5,87	8,35	20	0	3,26	6,42	8,57
40	0	2,85	6,40	8,30	40	0	2,78	6,53	7,61
60	0	2,57	6,30	7,80	60	0	2,44	6,32	7,10
90	0	2,12	5,33	6,46	90	0	2,12	6,45	6,60
120	0	1,94	5,22	6,22	120	0	2,01	6,44	6,85
					Tissu froid	0	2,94	6,20	9,60

TABLEAU III. — Expérience III.



Courbe III. — Expérience III.
(Légende : voir courbe I, p. 77)

Exp.	CULTURE	ACIDO-SOLUBLE				ACIDES NUCLEIQUES			
		R.N.A. initial	R.N.A. après 2h	Perte en γ	Perte %	R.N.A. initial	R.N.A. après 2h	Perte en γ	Perte %
II	Virulente	3,04	2,30	0,74	24	10,60	7,30	3,30	31
	Témoin		2,19	0,85	28		6,11	4,49	42
III	Virulente	3,17	1,94	1,23	33	10,25	6,22	4,03	39
	Témoin		2,01	1,16	36		6,85	3,40	33
	Tissu froid		2,94	0,23	7		9,60	0,65	6

TABLEAU IV. — Perte de RNA après 2 heures de culture.

4. — Tissu conservé à 4°.

Le tissu conservé à 4° dans le milieu nutritif pendant 120 mn accuse une très faible décroissance du RNA dans les fractions acido-soluble et acides nucléiques : 6 à 7 % (tableau IV).

CHAPITRE VIII

DISCUSSION

Ces expériences et leurs résultats mettent en évidence des faits relatifs au comportement du virus et du tissu en culture.

1. — Absence de parallélisme entre variations des acides nucléiques et propriétés biologiques du virus.

L'absence de tout parallélisme entre infectivité et fixation du complément d'une part, et variation des acides nucléiques d'autre part, au cours de la multiplication virale, ne permet aucune conclusion sur les modifications chimiques subies par la cellule envahie par le virus aphteux. Il ne semble pas qu'on puisse déceler, par l'analyse chimique des composés nucléiques, la présence et le développement du virus.

En particulier au début de la culture, la quasi disparition de l'infectivité et du pouvoir de fixation du complément rappelle exactement la phase éclipse des bactériophages. Pendant cette phase éclipse les phages pénètrent à l'intérieur de la bactérie sous forme de petites sous-unités riches en acides nucléiques. Ces unités provoquent dans la cellule une synthèse active d'acides nucléiques et se multiplient. En est-il de même pour le virus aphteux ? On pouvait s'attendre à une croissance des acides nucléiques au début de la culture. Or, dès les premières minutes, il y a une forte chute de RNA dans les cellules. Si le virus est riche en acide nucléique ou provoque dans la cellule la synthèse d'un acide nucléique, on peut penser qu'un effet antagoniste dû à un autre phénomène l'emporte. Par ailleurs les quantités d'acides nucléiques mises en jeu par la présence et l'activité du virus sont sans doute trop faibles pour être déce-

lables du moins actuellement, par analyse chimique ou spectrographique.

Ceci est dû en partie au fait que seulement une faible proportion des cellules est infectée. Les expériences ont montré que, dès les premières minutes le virus disparaît dans les cellules. Les blocs de tissus sont assez gros et seules les cellules de la couche superficielle sont atteintes. Si nous assimilons un bloc de tissu à un cube de 1 mm de côté et une cellule épithéliale à un cube de 25μ de côté, le calcul théorique montre que le nombre de cellules infectées représente 14 % du nombre total de cellules. Ce calcul suppose :

a) que toutes les cellules superficielles sont infectées ;

b) que toutes les faces du cube présentent des couches de cellules susceptibles de s'infecter. Or ce n'est pas le cas, car la couche d'épithélium « stratum germinativum » et quelques couches supérieures sont très favorables au développement du virus, mais non les couches de cellules plus ou moins kératinisées. Le nombre de cellules infectées est donc certainement bien inférieur à 14 %.

En fait, dans chaque prélèvement, il y a toujours une proportion assez faible de cellules infectées, ce qui diminue évidemment la modification relative due à la présence du virus. Il n'est pas impossible d'envisager une étude plus précise et des résultats appréciables le jour où la culture serait faite sur des cellules isolées et dont toutes ou presque toutes seraient infectées.

2. — Chute du RNA et stabilité du DNA.

Alors que les variations du DNA sont faibles, oscillent autour d'une valeur moyenne et paraissent non significatives, la décroissance du RNA dans les cultures témoins et virulentes est considérable. Il semble que les cellules mises en culture en blocs plus ou moins gros se lysent peu à peu ; le cytoplasme passe dans le milieu de culture, entraînant le RNA, tandis que le noyau reste intact comme le prouve la stabilité du DNA.

Cette décroissance du RNA exprime-t-elle autre chose que la mort lente du tissu ? Si le dosage de la quantité d'acides nucléiques d'un tissu peut servir à mesurer sa croissance (WIL-

LMER [75]), et si en particulier la croissance du RNA est étroitement liée à la croissance des tissus (DAVIDSON, LESLIE et WAYMOUTH [15]), la décroissance du RNA n'est-elle pas significative de la mort du tissu ? Cette mort apparente est bien confirmée par l'aspect nécrotique que prend le tissu au fur et à mesure que la culture se prolonge.

Comment expliquer cette dégradation très rapide du tissu ? Sans doute bien des facteurs influencent la vitalité du tissu mis en culture : milieu nutritif, température, oxygénation, pH, etc. Pourtant les expériences faites sur le début de la culture nous apportent des éléments de solution.

La diminution du RNA au cours des 2 premières heures de culture ne paraît pas due au virus puisqu'elle est sensiblement la même à ce moment-là pour culture témoin et culture virulente. D'autre part, du tissu mis dans le milieu de culture à 4° perd une quantité de RNA faible, mais non négligeable. Au cours du découpage par les ciseaux, un certain nombre de cellules sont déchirées. Ceci permet d'expliquer de deux façons d'ailleurs additives la perte de RNA.

a) Dans les cellules brisées, le cytoplasme passe peu à peu de la cellule brisée dans le milieu. Ceci permet d'expliquer la perte de 6 à 7 % de RNA du tissu placé dans le milieu de culture à 4°.

b) De plus, les enzymes des cellules déchirées sont mis en liberté. A 4°, leur action est négligeable, mais lorsque l'ensemble est porté à 37°, leur action est au contraire maxima. Cette action des enzymes provoquerait une dégradation du RNA des cellules.

Si nous considérons qu'en moyenne, au cours des deux premières heures de culture la perte de RNA dans la fraction acides nucléiques a été de 36 %, il est permis de penser que 6 à 7 % proviennent du RNA du cytoplasme des cellules brisées et 29 à 30 % de l'action des enzymes libérés par le découpage des cellules.

Ceci permet d'expliquer aussi que, au cours des 2 premières heures, la perte de RNA dans la fraction acido-soluble soit un peu plus faible que dans la fraction acides nucléiques : 30 % au lieu de 36 %. Pendant le temps court mais non négligeable (quelques minutes) de la pesée du tissu, les enzymes peuvent dégrader une partie du RNA en nucléotides à ribose qui passent dans l'acido-soluble.

L'influence des enzymes paraît donc primordiale dans la dégradation du tissu mis en culture.

3. — Différence entre culture virulente et culture témoin.

Pourtant la présence du virus accélère cette mort du tissu.

En effet, si la décroissance du RNA est considérable dans les cultures témoins, elle l'est davantage encore dans les cultures infectées. Le virus qui atteint les cellules en modifiant les réactions métaboliques normales à l'intérieur de la cellule, entraînerait une lyse plus rapide de celle-ci, ce qui est en accord avec la perte plus importante de RNA. Par contre le DNA restant sensiblement constant, les noyaux des cellules ne sont pas altérés.

Puisque le virus accélère légèrement la lyse des cellules, il semble qu'il se multiplie dans le cytoplasme. Dans un cas un peu différent, SOURANDER [67] tire une conclusion analogue de la constatation que, dans des cellules nerveuses embryonnaires infectées par la rage, décroissance du RNA, décroissance des protéines et croissance du titre de virulence sont liées : la souche Flury de la rage semble se multiplier dans le cytoplasme des cellules. Les résultats obtenus par SOURANDER décelaient une différence plus marquée entre cellules infectées et cellules normales que celle qui ressort de nos expériences.

Le fait que le virus de la fièvre aphteuse se multiplie dans le cytoplasme des cellules tendrait à prouver que le virus de la fièvre aphteuse est bien un virus à RNA. Cette conclusion sur la nature chimique du virus aphteux semble apporter une preuve supplémentaire aux résultats obtenus par JANSSEN [43]. Elle serait en accord aussi avec l'hypothèse de HYDEN [41] selon laquelle un virus de faible dimension comme le virus aphteux doit être un virus à ribose.

4. — Relation avec des études antérieures.

Cette dégradation du tissu, mise en évidence par le dosage du RNA et aggravée par la présence du virus, confirme des travaux antérieurs du laboratoire de recherches de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse.

a) La vitalité du tissu mis en culture a été étudiée en mesurant le *pouvoir d'oxydo-réduction des cellules* [37] en utilisant une méthode, dérivée de celle de THUNBERG [69] qui consiste à déterminer le temps de décoloration de tissu imprégné de bleu de méthylène sous l'influence des deshydrogénases du tissu. Le temps de décoloration est fonction de la présence de ces enzymes et semble par convention pouvoir mesurer la vitalité des cellules. Or, au cours de la culture, on observe une élévation du temps de décoloration. Si l'on compare culture virulente et culture témoin, les temps de décoloration sont voisins pendant 20 à 25 heures, puis celui du tissu virulent croît plus vite que celui du tissu non infecté comme le montre le tableau suivant :

Temps de Culture en Heures	Temps DECOLORATION Culture TEMOIN (mn)	Temps DECOLORATION Culture VIRULENTE (mn)
0	19	22
5	31	31
10	33	35
15	40	45
20	46	50
25	62	75
30	67	98
40	105	180
50	240	

Ainsi la vitalité du tissu infecté de virus serait moins longue que celle du tissu témoin mis en culture, mais pour l'un et l'autre, cette vitalité est brève.

b) Des recherches faites par chromatographie sur papier des *acides aminés du milieu de culture* [37] ont montré qu'il n'y a pratiquement pas de différence entre la teneur en amino-acides des prélèvements au cours de la culture, et que la teneur en azote ultrafiltrable de ces prélèvements est sensiblement constante. Il semble donc que le tissu n'utilise qu'une faible part des amino-

acides mis à sa disposition et par conséquent qu'il a peu d'activité vitale.

Tous ces résultats sont concordants : le tissu se dégrade vite et la dégradation est accélérée par l'infection virale. Ceci s'explique assez bien si l'on songe que l'épithélium lingual est essentiellement, dans l'organisme, un tissu de protection. Ce n'est donc pas un tissu d'une grande activité biologique ; dans l'organisme vivant, il se renouvelle sans cesse mais très lentement.

CONCLUSIONS

Au début de ce travail, nous nous proposons d'étudier, par voie chimique, un phénomène biologique : la multiplication du virus de la fièvre aphteuse, en cherchant à établir un lien entre la teneur en acides nucléiques du tissu infecté et le développement de l'infection virale. Notre but pratique était de mieux comprendre le mécanisme de la multiplication intracellulaire du virus et le mode de vie du tissu en culture, pour tenter d'améliorer la culture du virus aphteux selon la méthode de FRENKEL.

S'il ne paraît pas possible d'établir une relation, intéressante du point de vue théorique, entre la teneur en acides nucléiques des cellules et la présence du virus, décelé par mesure d'infectivité et de fixation du complément, il n'en reste pas moins que ces recherches ont mis en lumière un certain nombre de faits concernant le développement du virus et le comportement du tissu qui orientent de façon pratique les recherches des biologistes et des virologistes.

Le fait le plus marquant mis en évidence par nos recherches sur les acides nucléiques est cette décroissance rapide du RNA, que le tissu soit ou non virulent, indice d'une dégradation beaucoup trop rapide du tissu. Non seulement le tissu n'est pas à proprement parler en « culture », c'est-à-dire en cours de développement, mais il est à peine en survie, et la dégénérescence est encore augmentée par l'action du virus.

Le rapprochement s'impose avec les résultats des travaux très récents de WOMACK et KASS [78]. Leur étude est assez proche de la nôtre puisqu'il s'agit aussi de recherches quantitatives sur le contenu en acides nucléiques du tissu, membrane chorio-allantoïde, mis en culture et infecté par le virus de l'influenza. L'allure des courbes de variation (décroissance rapide du RNA, variation non significative du DNA) est la même (voir courbe p. 28). Ces auteurs notent d'autre part que l'incorporation de P radio-actif dans les cultures de tissu est rapide mais de même

vitesse que la culture soit ou non virulente ; cela prouve par conséquent une survie du tissu. Mais un net effet de dégradation prédomine. S'il en est ainsi pour la membrane chorio-allantoïde qui est un tissu embryonnaire donc en plein développement, on peut s'attendre à plus forte raison à rencontrer cette dégradation dans le cas de l'épithélium lingual qui se reproduit lentement. Dans l'un et l'autre cas, l'action du virus se manifeste par une mort plus rapide du tissu mis en culture.

Or il est bien certain que le virus ne pouvant se développer que dans des cellules vivantes, sa multiplication est d'autant plus active que la vitalité des cellules est plus grande. Il semble donc que des recherches dans le but d'améliorer la survie de l'épithélium lingual *in vitro* paraissent nécessaires et conduiraient à un meilleur rendement dans la production du virus aphteux.

Un facteur important de cette dégradation tissulaire est la présence des enzymes mis en liberté par le découpage de l'épithélium. Notre mise au point d'une méthode nouvelle d'extraction des acides nucléiques, dont l'originalité réside surtout dans la protection par le froid et l'alcool de toute dégradation, a bien mis en lumière aussi cette action des enzymes du tissu libérés alors par le broyage. Il ne semble pas que, jusqu'à maintenant, on ait porté assez d'attention à cette influence des enzymes, et les techniques qui permettraient de limiter ou même d'inhiber leur action seraient favorables à un meilleur rendement de la culture *in vitro* du virus aphteux.

Les résultats de ce travail sur le dosage chimique des acides nucléiques dans l'épithélium lingual bovin infecté par le virus de la fièvre aphteuse ouvre ainsi la voie à une série de recherches biologiques.

Cette étude purement chimique des acides nucléiques en liaison avec des mesures biologiques ou sérologiques permet de tirer des conclusions pratiques fécondes. C'est une illustration de l'importance de la chimie dans la recherche biologique et virologique. Les phénomènes biologiques se traduisent en dernier ressort par une équation chimique et réciproquement la connaissance de certaines variations chimiques permet d'appréhender le phénomène biologique.

C'est par la coordination des techniques physiques, chimiques

et biologiques que peuvent croître nos connaissances sur le virus, organisme vivant le plus simple mais dont la compréhension totale aiderait beaucoup l'étude d'organismes plus complexes, s'il est vrai, comme le pense HOYLE [40], que le processus de multiplication biologique est fondamentalement le même dans tous les organismes vivants.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACKERMANN W.-W., FRANCIS T. — *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, 1950, 74, 123.
2. ASTBURY W.-T., BELL F.-O. — *Nature*, 1938, 141, 747.
3. BAWDEN F.-C., PIRIE N.-W. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1937, B, 123, 274.
4. BRACHET J., CHANTRENNE H. — *Nature*, 1951, 168, 950.
5. BROOKSBY J.-B. — *ACR Rep. Ser.*, 1952, 12, 39.
6. CAMAND R. — *Thèse doctorat vétérinaire Lyon*, 1953.
7. CAMAND R., HIRTZ J. — *Bull. Soc. Sc. Vét. Lyon*, 1953, 54-55, 341-49.
8. CASPERSSON T., SCHULTZ J. — *Nature*, 1938, 142, 294.
9. CASPERSSON T. — *Die Naturwissenschaften*, 1941, 29, 33.
10. CASPERSSON T., HYDEN H. — *Nord. med. tidsk.*, 1945, 28, 2.631.
11. COHEN S.-S. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 174, 281.
12. DAVIDSON J.-N. — *The Biochemistry of the Nucleic Acids.*, 1950, p. 137.
13. DAVIDSON J.-N. — *The Biochemistry of the Nucleic Acids.*, 1950, p. 73.
14. DAVIDSON J.-N. — *The Biochemistry of the Nucleic Acids.*, 1950, p. 5-19.
15. DAVIDSON J.-N., LESLIE L., WAYMOUTH C. — *Biochem. J.*, 1949, 44, 5-17.
16. DORNER R.-W., KNIGHT C.-A. — *J. Biol. Chem.*, 1953, 205, 959-967.
17. DISCHE Z. — *Microchemie*, 1930, 8, 4.
18. DELBRUCK M. — Conférence Francfort O/M, 16 mars 1954.
19. DRASHER M.-L. — *Science U.S.A.*, 1953, 118, 3.059, 181, 3.
20. EVANS E.-A. — *Bact. Rev.*, 1950, 14, 210-218.
21. EVANS E.-A. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, n° 1, 129-142.
22. FRENKEL H.-S. — *Am. J. Veter. Res.*, 1950, 11, 371-373.
23. FRENKEL H.-S. — *Am. J. Veter. Res.*, 1951, 12, 187-190.
24. FRENKEL H.-S. — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1947, 28, 155-162.
25. FRENKEL H.-S. — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1953, 39, 93-97.
26. FRENKEL H.-S. — *Am. J. Veter. Res.*, 1952, 13, 21-23.
27. FRENKEL H.-S. — *Nature*, 1949, 164, 235-236.
28. FRENKEL H.-S. — *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1949, 115, 178.
29. FRIEDRICH-FRESKA H. — *Naturwissensch.*, 1940, 28, 376.
30. FRANKLIN R.-E., GOSSLING R.-G. — *Nature*, 1953, 171, 740.
31. GAMOW G. — *Nature*, 1954, 173, 318.

32. GALE E.-F., FOLKES J.-P. — *Nature*, 1954, 173, 1.223-1.227.
33. GIRARD H., MACKOWIACK C. — *Revue d'imm.*, 1953, XVII, 4-5, 224-238.
34. GIRARD H., MACKOWIACK C., HIRTZ J., CAMAND R. — *Revue d'imm.*, 1953, XVII, 4-5, 239-250.
35. HAMMERLING. — *J. Arch. Entw Mech.*, 1934, 131, 1.
36. HERSHEY A.-D. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, 99-114.
37. HIRTZ J., MACKOWIACK C., FAYET M.-T. — A paraître.
38. HIRTZ J., CAMAND R. — *Revue d'imm.*, 1954, XVIII, 3, 206-213.
39. HIRTZ J., FAYET M.-T. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, à paraître.
40. HOYLE L. — *Symp. of the Nature of Virus Multiplication Oxford*, 1952, p. 225.
41. HYDEN H. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1947, 12, 104.
42. JANSSEN L.-W. — *Vers. Weekz. Staats Senij. Onderz. S. Gravenhague*, 1938, 62-67.
43. JANSSEN L.-W. — *Konin. Nederl. Ak. Van Wetenschappen*, 1949, 52, 9, 1.017-1.025.
44. JOHNSON R.-B., ACKERMANN W.-W. — *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1954, 86, 2, 318.
45. KNIGHT C.-A. — *Ann. Rev. of Microb.*, 1949, 3, 121-136.
46. KOZLOFF L.-M., PUTNAM F.-W. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 182, 229.
47. LURIA S.-E. — In Delbrück : *Viruses*, 1950, Pasadena.
48. MACHEBŒUF M., DELSAL J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, XXV, 16.
49. MALLETTE M.-F., LAMANNA C. — *Arch. of Bioch. and Bioph.*, 1953, 47, 174-189.
50. MARKHAM R. — *Advances in Virus Research*, 1953, p. 329.
51. MARKHAM R., MATTHEWS R.-C.-F., SMITH K.-M. — *Nature*, 1948, 162, 88.
52. MARKHAM R., SMITH J.-D. — *The Proteins*, vol. II A, 1954, p. 10-12.
53. MEJBAUM W. — *Hopp Seyler's Ztschr f. physiolog. Chem.*, 1939, 258, 117-120.
54. MOULÉ Y. — *Arch. Sc. Physiol.*, 1953, 7, 3, 241-254.
55. OGUR M., ROSEN Q. — *Arch. Biochem.*, 1950, 25, 262.
56. PAULING L., DELBRUCK M. — *Science*, 1940, 92, 77-79.
57. PENSO G. — Dans Hauduroy P. *Problèmes actuels de virologie*, 1954, p. 107-130.
58. POLLARD E.-C. — *The Physics of Viruses*, 1954, p. 7.
59. POTTER V.-R., ELVEHJEM. — *J. of Biol. Chem.*, 1936, 114, 495-504.
60. REED L.-J., MUENCH H. — *Am. J. Hyg.*, 1938, 27, 493.
61. SCHAFER W. — *Bull. Munsch. Tierärztl Wschrft*, 1953, 66, 165.
62. SCHLESINGER M. — *Biochem. Z.*, 1933, 264, 6.
63. SCHLESINGER M. — *Nature*, 1936, 138, 508.

64. SCHMIDT G., THANNHAUSER S.-J. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 161, 83.
65. SCHNEIDER W.-C. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 161, 293-302.
66. SKINNER H.-H. — *Comp. Med. of Roy. Soc. of Med.*, 1951, 44, 1.041-1.044.
67. SOURANDER P. — *Act. Path. et Microb. Scand.*, Suppl. XCV, 1953, 1, 87.
68. TERROINE E.-F. — *La synthèse protéique*, 1952, p. 381-409.
69. THUNBERG T. — *Ergebn. d. Enzymforsch*, 1938, 7, 163.
70. VANDERHAEGUE F. — *Biophys. et Biochim. Acta*, 1954, 15, 2, 281, 7.
71. VON MAGNUS P. — *Act. Path. Microb. Scand.*, 1951, 28, 278.
72. VON MAGNUS P. — *Bull. Org. mond. Santé*, 1953, 8, 647.
73. WATSON J.-D., CRICK F.-H.-C. — *Nature*, 1953, 171, 737.
74. WATSON J.-D., CRICK F.-H.-C. — *Nature*, 1953, 171, 964.
75. WILLMER E.-N. — *J. Exp. Biol.*, 1942, 18, 237.
76. WILKINGS M.-H.-F., STOKES A.-R., WILSON H.-R. — *Nature*, 1953, 171, 738.
77. WYATT G.-R. — *J. Gen. Physiol*, 1952, 36, 201.
78. WOMACK C.-R., KASS E.-H. — *The J. of Imm.*, 1953, 71, 3, 152.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

ACTION DE LA FORMALDÉHYDE
SUR LES PROTÉINES

Vu :

Les Membres du Jury :

MM. COLONGE
MENTZER
CHOPIN

Vu et approuvé

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
R. DOUIN

Vu et accordé le permis d'imprimer

Lyon, le 23 Novembre 1954

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

A. ALLIX

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
PLAN	9
<i>Première partie. — Données bibliographiques</i>	
Les acides nucléiques dans les tissus animaux	15
Les acides nucléiques dans la multiplication des virus	19
Les acides nucléiques dans les tissus infectés de virus	25
<i>Deuxième partie. — Dosage des acides nucléiques dans</i>	
<i>l'épithélium lingual bovin</i>	<i>31</i>
Techniques et méthodes	33
Isolement des acides nucléiques de l'épithélium lin-	
gual bovin	44
<i>Troisième partie. — Les acides nucléiques au cours de la</i>	
<i>multiplication du virus aphteux</i>	<i>65</i>
Cultures prolongées	67
Début de culture	74
Discussion	81
CONCLUSIONS	87
BIBLIOGRAPHIE	91

